

上 申 書

平成10年6月9日

特許庁長官 荒 井 寿 光 殿

1. 事件の表示

平成3年特許願第515732号

2. 上申をする者

事件との関係 特許出願人

名称 ノボ ノルディスク アクティーゼルスカブ

3. 代 理 人

住所 〒105-8423 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル

青和特許法律事務所 電話 03-5470-1900

氏名 弁理士(7751)石 田 敬



4. 上申の内容

本願の明細書及び請求の範囲の補正に関して簡単に説明させていただきます。

(1) 明細書の配列表につきましてはアミノ酸の番号及び塩基の番号を訂正致しました。かかる訂正は、出願当初の明細書におけるアミノ酸の番号についての言及が成熟リパーゼのアミノ酸番号付けに基づくのに対し、配列表内の番号付けがプレプロリパーゼのアミノ酸番号付けに基づくため、両者の番号付けを一致させるために行ったものであります(プレプロ配列は22個のアミノ酸より成ります)。

(2) 請求項1における但し書きは、本願リパーゼ変異体を、先行文献ヨーロッパ特許出願第0375102号(対応の日本国出願特開平2-225599号)

公開公報

4字加入

記載のリパーゼ変異体と区別するための事項であります。参考のため、かかる文献を添付致します。

5. 添付書類の目録 (公開公報)

(1) ヨーロッパ特許出願第0375102号

1通

4字加入

(2) 特開平2-225599号

1通

以 上



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

Publication number:

**0 375 102
A2**

⑫

EUROPEAN PATENT APPLICATION

⑪ Application number: 89306375.0

⑨ Int. Cl. 5: **C11D 3/386, C11D 3/39,
C12N 15/55, C12N 9/20**

⑫ Date of filing: 23.06.89

⑭ Priority: 19.12.88 US 286353

⑬ Date of publication of application:
27.06.90 Bulletin 90/26

⑮ Designated Contracting States:
AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE

⑦ Applicant: The Clorox Company
1221 Broadway
Oakland California 94612(US)

⑧ Inventor: Poulouse, Ayrookaram, J.
2540 Carmel Drive
San Bruno California 94066(US)
Inventor: Anderson, Susan A.
3499 Edison Way
Menlo Park California 94025(US)

⑯ Representative: Meyer, Ludgerus et al
Patentanwälte Meyer, Stach, Vonnemann
Jungfernstieg 38
D-2000 Hamburg 36(DE)

① Enzymatic peracid bleaching system with modified enzyme.

② An enzymatic perhydrolysis system, useful for bleaching, has a novel enzyme, a substrate, and a source of hydrogen peroxide, and provides in situ formation of peracid in aqueous solution. The substrate is selected for enzyme catalyzed reaction, and preferably is an acylglycerol with two or three fatty acid chains. The enzyme is hydrolytically and perhydrolytically active even in the presence of anionic surfactants, has lipase activity, and is modified from an enzyme isolatable from Pseudomonas putida ATCC 5352.

EP 0 375 102 A2

ENZYMATIC PERACID BLEACHING SYSTEM WITH MODIFIED ENZYME

This invention relates to an enzymatic peracid bleaching system with modified enzyme; more particularly, it relates to an enzymatic perhydrolysis system and to a method of use for the system in aqueous solution for achieving enhanced bleaching.

Various bleaches have long been employed in numerous cleaning applications, including the washing and prewashing of fabrics, as well as in other applications, such as hard surface cleaning. In these applications, the bleaching agent oxidizes various stains or soils on fabrics, textiles and hard surfaces.

Peroxygen bleaching compounds, such as hydrogen peroxide, sodium percarbonate and sodium perborate, have been found useful in dry bleach formulations because of their oxidizing power.

It has also been found that addition of certain organic compounds, including activators, such as tetracetyl ethylene diamine, to perborate bleaches can improve bleaching performance because of in situ formation of peracids.

Cleaning compositions for fabrics, textiles and other materials including hard surfaces have also been developed which employ various enzymes for removing certain stains or soils. For example, protease enzymes have been found useful for hydrolyzing protein-based stains particularly in the cleaning of fabrics. Amylase enzymes have been found useful against carbohydrate-based stains resulting for example from foods. Lipase enzymes have also been found useful for hydrolyzing fat-based stains in a prewash or presoak mode.

In connection with the use of enzymes in cleaning or detergent compositions, European Patent Application, publication No. 0 130 064, applied for by Novo Industry A/S, related to improvements in enzymatic additives for use with detergents in washing applications. That publication discussed the use of lipase enzymes for achieving substantially improved lipolytic cleaning efficiency, over a broad range of wash temperatures including relatively low temperatures below 60° C. This reference further disclosed the use of enzymes, including lipases, for direct interaction with stains or soils as a means of at least partially dissolving or loosening such fat-based stains.

U.S. Patent 3,974,082, issued August 10, 1976 to Weyn, disclosed a bleaching composition and method of use in which an alkyl ester was combined with an esterase or lipase enzyme in an aqueous medium and which was contended to liberate an acyl moiety from the ester. The Weyn patent further contended that the use of this combination together with a percompound would lead to in situ formation of peracid.

Accordingly, there has been found to remain a need for improved bleaching or activated oxidant systems capable of enhanced performance in aqueous solution at low temperature wash conditions while still maintaining high temperature performance.

The present invention provides an activated oxidant system for achieving enzymatic perhydrolysis of a substrate in the presence of a source of hydrogen peroxide to produce a peracid. Novel enzymes of the invention act catalytically to enhance the reaction of substrates resulting in the in situ formation of peracids. These enzymes have excellent perhydrolysis characteristics and good reactivity for triglyceride substrates, even in the presence of anionic surfactants. Thus, the enzymatic perhydrolysis system of the present invention is compatible with commercially available detergents utilizing anionic surfactants.

Novel enzymes of the invention are modified with respect to a reference enzyme. The reference enzyme is isolatable from Pseudomonas putida ATCC 53552, and has the following amino acid sequence:

	1	ala	pro	leu	pro	asp	thr	pro	gly	ala	10	pro	phe	pro
5		ala	val	ala	asn	phe	asp	arg	20	ser	gly	pro	tyr	thr
		thr	ser	ser	gln	ser	30	gly	pro	ser	cys	arg	ile	
					40	arg	asp	leu	gly	gln	gly	gly	val	arg
10		tyr	arg	pro										
		his	50	pro	val	ile	leu	trp	gly	asn	gly	thr	gly	60
														ala
		gly	pro	ser	thr	tyr	ala	gly	leu	leu	70	ser	his	trp
15														
		ala	ser	his	gly	phe	val	val	80	ala	ala	ala	glu	thr
		ser	asn	ala	gly	thr	90	gly	arg	glu	met	leu	ala	cys
20														
		leu	asp	tyr	100	leu	val	arg	glu	asn	asp	thr	pro	tyr
		gly	110	thr	tyr	ser	gly	lys	leu	asn	thr	gly	arg	120
														val
25		gly	thr	ser	gly	his	ser	gln	gly	gly	130	gly	gly	ser
		ile	met	ala	gly	gln	asp	thr	140	arg	val	arg	thr	thr
30														
		ala	pro	ile	gln	pro	150	tyr	thr	leu	gly	leu	gly	his
		asp	ser	ala	160	ser	gln	arg	arg	gln	gln	gly	pro	met
35		phe	170	leu	met	ser	gly	gly	gly	asp	thr	ile	ala	180
														phe
		pro	tyr	leu	asn	ala	gln	pro	val	tyr	190	arg	arg	ala
40		asn	val	pro	val	phe	trp	gly	200	glu	arg	arg	tyr	val
		ser	his	phe	glu	pro	210	val	gly	ser	gly	gly	ala	tyr
		arg	gly	pro	220	ser	thr	ala	trp	phe	arg	phe	gln	leu
45														
		met	230	asp	asp	gln	asp	ala	arg	ala	thr	phe	tyr	240
														gly
		ala	gln	cys	ser	leu	cys	thr	ser	leu	250	leu	trp	
50														
		ser	val	gly	arg	arg	gly	leu						

Modified enzymes of the invention differ from the reference enzyme by at least 1 amino acid occurring
 ss either: (1) within about 15 angstroms of serine 126, aspartic acid 176 or histidine 206 (with respect to the
 tertiary structure of the reference enzyme); or (2) within about 6 amino acids on either side of serine 126,
 aspartic acid 176 or histidine 206 (with respect to the primary structure of the reference enzyme). The
 substrate of the activated oxidant system is selected for enzyme catalyzed reaction, in the presence of a

source of hydrogen peroxide, to form peracid. Various triglycerides are particularly suitable for forming the substrate. Particularly preferred substrates are trioctanoin and tridecanoin.

The oxidant system of the invention includes a source of hydrogen peroxide which will combine with the substrate, when activated by the enzyme, to produce *in situ* an organic peracid. For United States
5 laundry conditions, a particularly preferred organic peracid so generated is peroctanoic acid.

The enzymatic perhydrolysis system of the invention provides a number of advantages, including the employment of a relatively inexpensive substrate together with a small amount of an enzyme, for producing the resulting peracid. The preferred triglyceride substrates provide the ability to yield a higher concentration of peracid than provided by equivalent concentrations of a simple ester substrate. The enzymatic
10 perhydrolysis system of the invention has been found to be very effective for producing peracid in low temperature wash solution.

Referring to the accompanying illustrative drawings:

Figure 1 is a map of the 4.3 kb EcoRI fragment of a plasmid designated pSNE4. The region crosshatched represents signal peptide codons (codons -22 to +1) and the stippled region indicates the
15 coding region (codons +1 to +258) for the mature polypeptide designated Lipase 1. The ATG initiation codon and TAA stop codon are also marked; and

Figure 2 illustrates an *E. coli* expression vector for the *Pseudomonas* Lipase 1 gene. The stippled region indicates the coding region for the lipase signal sequence of 22 amino acids. The crosshatched region indicates the coding region for the mature lipase protein. Transcription starts at the ATG initiation
20 codon and proceeds in the direction indicated by the arrow to the TAA stop codon. The dark regions on either side indicate the 5' - and 3' - untranslated regions.

The enzymatic perhydrolysis system of the present invention essentially comprises a novel enzyme as defined below, a substrate, and a source of hydrogen peroxide. Accordingly, the invention is based upon peracid or perhydrolysis chemistry.

In addition to the essential components of the enzymatic perhydrolysis system including novel
25 enzymes, a substrate and a hydrogen peroxide source, the perhydrolysis system of the invention also preferably includes one or more emulsifying agents selected for maintaining the substrate in suspension, or solubilizing, the substrate when in aqueous solution and for promoting interaction of the substrate and enzyme in the presence of hydrogen peroxide from the hydrogen peroxide source. Use of one or more
30 emulsifying agents of this type is particularly contemplated so that the emulsifying agent can assist in forming a liquid phase interface at which the enzyme can better interact with a glyceride substrate. The perhydrolysis system may also preferably include various buffering agents, stabilizers and other adjuncts described in greater detail below.

In order to ensure proper understanding and interpretation of the invention, including the summary and
35 preferred embodiments as well as the claims, some definitions are set forth below to clarify the use of terms employed herein. The defined terms include the following.

"Perhydrolysis" is defined as the reaction of a selected substrate with peroxide to form a peracid and water.

In the preferred perhydrolysis reactions yielding a peracid, both the peroxide starting material and the
40 peracid product are oxidants. Traditionally, inorganic peroxide has been used as the oxidant, for example, in dry laundry bleaches. The peracid product is usually the desired oxidant for laundry bleaches according to the present invention, since the oxidative ability of the peracid product makes it an effective stain removal agent for laundry bleaches, yet the peracid product as oxidant remains sufficiently mild to assure only minimal reaction with dyes and other adjuncts used in laundry bleach products. However, it is within the
45 scope of the present invention that the enzymatic perhydrolysis system be combined with a chemical perhydrolysis system.

"Chemical perhydrolysis" generally includes those perhydrolysis reactions in which an activator or peracid precursor is combined with a source of hydrogen peroxide. A type of peracid precursor for chemical perhydrolysis is disclosed in U.S. Patent No. 4,735,740, issued April 5, 1988, entitled
50 "DIPEROXYACID PRECURSORS AND METHOD", of common assignment herewith. This application describes sulfonated phenyl esters of dicarboxylic acids which are water soluble and give peroxyacids upon dissolution in water with a source of peroxide by means of *in situ* chemical perhydrolysis.

"Enzymatic perhydrolysis" is defined as a perhydrolysis reaction which is assisted or catalyzed by an enzyme generally classified as a hydrolase, and more specifically identified below.

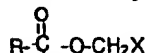
Characteristics and preferred examples of the three essential components of the enzymatic perhydrolysis system are first discussed below, followed by a brief discussion of other adjuncts which may be
55 used with the perhydrolysis system and then a number of examples illustrating the enzymatic perhydrolysis system of the invention.

As noted above, the substrate of the enzymatic perhydrolysis system is selected for enzyme catalyzed reaction, in the presence of a source of hydrogen peroxide, to form peracid. As will be discussed in greater detail below, certain substrates are normally present as solids and particularly lend themselves to use in dry formulations including the substrate, enzyme and peroxide source. In such products, it is important that the dry formulation exhibit prolonged shelf life with the enzyme catalyzed reaction not taking place until the formulation is added to an aqueous solution.

For use in a laundry detergent formulation, for example, the substrate may also include surfactant characteristics so that in situ formation of the peracid occurs at or near the surface of the fabric to be cleaned. This assures greater effectiveness of the oxidant responsible for bleaching action.

The substrate of the enzymatic perhydrolysis system may be chosen from a variety of different esters (RCOOR'), as the novel enzyme has esterase activity, may be a lipid, as the novel enzyme also has lipase activity, or may be a combination of both (e.g. fatty acid ester lipids). It has been found, in accordance with the present invention, that various fatty acid or glyceride type materials are particularly suitable for forming the substrate of the present enzymatic perhydrolysis system.

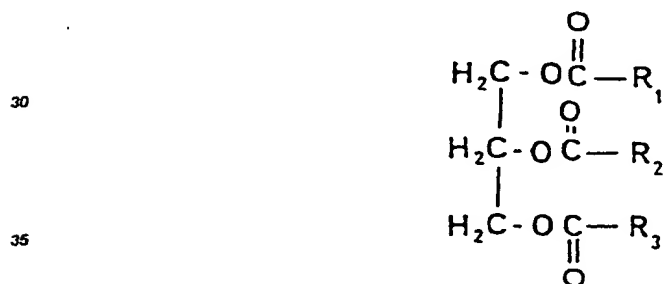
Preferably, the substrate of the present invention is a functionalized ester having the structure



wherein R is a substituent having at least one carbon atom, more preferably where R is a straight chain or branched chain alkyl optionally substituted with one or more functional groups or heteroatoms such as a phenol group, a halo group or atom, etc. and X is a functional moiety. The substrate is capable of enzymatic hydrolysis as defined above and preferably is ordinarily incapable of substantial chemical perhydrolysis. More preferably, the functional moiety comprises a functionalized polyol or polyether. More broadly, the functional moiety includes at least one carbon atom and at least one functional group.

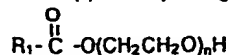
Even more preferably, the substrate of the invention is selected from the group consisting essentially of:

(i) glycerides having the structure



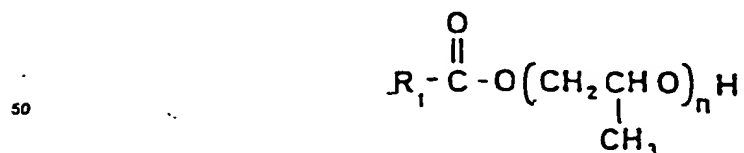
wherein $R_1 = C_1-C_{12}$, $R_2 = C_1-C_{12}$ or H and $R_3 = C_1-C_{12}$ or H;

(ii) an ethylene glycol derivative or ethoxylated ester having the structure



wherein $n = 1-10$ and R_1 is defined above; and

(iii) a propylene glycol derivative or propoxylated ester having the structure



wherein R_1 and n are defined as above.

Within the preferred structures referred to immediately above, R_1 is more preferably C_6-C_{10} and most preferably C_7-C_9 , R_2 is more preferably C_6-C_{10} or H and most preferably C_7-C_9 or H and R_3 is more preferably C_6-C_{10} or H and most preferably C_7-C_9 or H. In structure (i) above, R_1 , R_2 and R_3 can be different chain lengths, and mixtures of such different glycerides are suitable in the present invention.

Glycerides undergo hydrolysis when boiled with acids or bases or by the action of lipases. The use of glycerides (that is, acylglycerols), especially diglycerides (diacylglycerols) and triglycerides (triacylglycerols), is particularly preferred within the enzymatic perhydrolysis system of the present invention since each triglyceride molecule is capable of yielding up to three fatty acid or peracid molecules on an equivalence basis. Thus, the use of such a glyceride may be particularly effective in achieving maximum oxidizing power in the presence of a peroxide source and enzyme as discussed in greater detail below.

Broadly, the glyceride substrate is characterized by fatty acid chains including from about 1 to about 18 carbon atoms. Lower molecular weight glycerides derived from such products as acetic acid naturally occur as liquids. Thus, additional processing steps may be necessary in order to include such a substrate in a dry formulation such as laundry detergent. However, the lower molecular weight glyceride products may also tend to be more effective in higher temperature cleaning applications.

High molecular weight glyceride substrates, such as stearic acid characterized by a chain of 17 carbon atoms, normally appear as solids and thus may facilitate their inclusion in a dry detergent formulation, for example. However, such high molecular weight fatty acid chains may not produce maximum oxidizing power in accordance with the present invention.

The most preferred form of substrate for use within the enzymatic perhydrolysis system of the invention has been found to be either trioctanoin or tridecanoin characterized respectively by fatty acid chains (including the carbonyl carbon) of 8 and 10 carbon atoms.

These two triglycerides also tend to be present as solids and thus lend themselves to inclusion in a dry formulation as discussed above. At the same time, trioctanoin and tridecanoin tend to exhibit surfactant characteristics within aqueous solution lending themselves to in situ formation of peracid as discussed above.

All of the substrates discussed above including triglycerides, such as the most preferred trioctanoin and tridecanoin, are relatively inexpensive and are thus also important for reducing initial cost of the enzymatic perhydrolysis system of the present invention. As will also be discussed below, the substrate and hydrogen peroxide source are the two major components of the enzymatic perhydrolysis system in that the enzyme need only be present in very small amounts, less than stoichiometric, to carry out the in situ peracid production contemplated in the aqueous solution. The enzyme thus acts in a catalytic manner in that, while it participates in the reaction, it is not consumed but regenerates itself for further reaction.

Virtually any source of peroxide is satisfactory as the oxidant source of the enzymatic perhydrolysis system of the invention. For example, the peroxide source may comprise a perborate or percarbonate such as sodium perborate or sodium percarbonate. In addition, the peroxide source may comprise or include hydrogen peroxide adducts such as urea hydrogen peroxide, etc.

Preferred sources of peroxide include sodium perborate monohydrate, sodium perborate tetrahydrate, sodium carbonate peroxyhydrate, sodium pyrophosphate peroxyhydrate, urea peroxyhydrate, sodium peroxide, and mixtures thereof. Sodium perborate monohydrate and sodium perborate tetrahydrate are particularly preferred as alkaline sources of peroxide.

The source of peroxide (that is, compounds yielding hydrogen peroxide in an aqueous solution) itself constitutes a peroxygen bleaching compound. However, the enzymatic perhydrolysis system provides improved bleaching. Accordingly, further discussion of the particular oxidant source is not believed necessary except to the extent that the source is selected to produce hydrogen peroxide also in accordance with the preceding discussion.

A modified enzyme of the invention exists in a hostile, oxidizing environment during use of the enzymatic perhydrolysis system due to the presence of peroxide and the desired peracid. Either peroxide or peracid could inactivate an enzyme in use, so an enzyme suitable for the invention must be sufficiently perhydrolytically active at expected ranges of hydrogen peroxide and at desired ranges of peracid.

Modified enzymes of the invention are modified with respect to a reference enzyme. This reference enzyme is described in U.S. patent application S.N. 932,717, filed November 19, 1986. The reference enzyme (sometimes referred to as "Lipase 1") is secreted by and isolatable from a *Pseudomonas putida* strain. *Pseudomonas* is a genus of short, rod-shaped bacteria. Several strains, including *P. putida*, have been shown to have a limited ability to grow on a minimal media with mono-oleate polyoxyethylene ("Tween 80", available from Atlas Chemical) as carbon source. Howe et al., *J. Gen. Microbiol.*, 92(1), pp. 234-235 (1976). A culture of a novel *Pseudomonas putida* strain from which the Lipase 1 enzyme may be isolated has been deposited in accordance with MPEP 608.1(P) in the permanent culture collection of the American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, and has been designated ATCC 53552.

Although the reference enzyme is sometimes referred to as "Lipase 1", it should be understood that the modified enzymes and the reference enzyme can be viewed as lipases or cutinases. This is because

analysis of the amino acid sequence for the reference enzyme suggests there are substantial homologies between the nucleotide sequence for this enzyme and the nucleotide sequence of the cutinase gene recently determined for *C. capsici*. Thus, both modified enzymes of this invention and the reference enzyme will sometimes hereinafter be described as glycerol ester hydrolases, or simply as having
5 hydrolase activity.

Modified enzymes of the invention may be obtained as natural or artificial mutants of the *Pseudomonas putida* strain hereinabove described. Further, genetic engineering techniques applicable to lipase production, such as transformation of corresponding genes of the present strain to other cells, may also be applied, and the modified enzymes having hydrolase activity produced by these techniques and then
10 isolated are included in the present invention.

Thus, for example, the reference or modified enzyme may be produced by culturing *E. coli* including the gene for the desired enzyme in a conventional medium for enzyme isolation and purification. Liquid or solid culture can be used. Submerged aeration culture is preferable for industrial production. A conventional nutrient medium can be used.

15 Culturing temperature may vary depending on the desired rate of growth of the microorganisms and is preferably at 25°-35° C. Culturing time can be selected as desired, and is 15-50 hours. Culturing may be terminated when the highest concentration of enzyme having hydrolase activity is present in the medium.

The desired enzyme is accumulated in the fermentation broth and extraction of the produced enzyme from the broth can be effected as follows:

20 Cells and cell debris are first removed from the whole cell broth culture by microfiltration and centrifugation, followed by ultrafiltration to concentrate the lipase. Excess salts and color are then removed by dialysis or diafiltration. The crude enzyme solution can then be purified by conventional purification methods for proteins. A powder of the enzyme can be obtained by lyophilization and used in compositions of the invention.

25 The Lipase 1, or reference enzyme, has the following amino acid sequence:

30

35

40

45

50

55

	1	ala	pro	leu	pro	asp	thr	pro	gly	ala	10	pro	phe	pro	
		ala	val	ala	asn	phe	asp	arg	20	ser	gly	pro	tyr	thr	
5		thr	ser	ser	gln	ser	30	glu	gly	pro	ser	cys	arg	ile	
		tyr	arg	pro	40	arg	asp	leu	gly	gln	gly	gly	val	arg	
10		his	50	pro	val	ile	leu	trp	gly	asn	gly	thr	gly	60	ala
		gly	pro	ser	thr	tyr	ala	gly	leu	leu	70	ser	his	trp	
15		ala	ser	his	gly	phe	val	val	80	ala	ala	ala	glu	thr	
		ser	asn	ala	gly	thr	90	gly	arg	glu	met	leu	ala	cys	
20		leu	asp	tyr	100	leu	val	arg	glu	asn	asp	thr	pro	tyr	
		gly	110	thr	tyr	ser	gly	lys	leu	asn	thr	gly	arg	120	val
25		gly	thr	ser	gly	his	ser	gln	gly	gly	130	gly	gly	ser	
		ile	met	ala	gly	gln	asp	thr	140	arg	val	arg	thr	thr	
30		ala	pro	ile	gln	pro	150	tyr	thr	leu	gly	leu	gly	his	
		asp	ser	ala	160	ser	gln	arg	arg	gln	gln	gly	pro	met	
35		phe	170	leu	met	ser	gly	gly	gly	asp	thr	ile	ala	180	phe
		pro	tyr	leu	asn	ala	gln	pro	val	tyr	190	arg	arg	ala	
40		asn	val	pro	val	phe	trp	gly	200	glu	arg	arg	tyr	val	
		ser	his	phe	glu	pro	210	val	gly	ser	gly	gly	ala	tyr	
		arg	gly	pro	220	ser	thr	ala	trp	phe	arg	phe	gln	leu	
45		met	230	asp	asp	gln	asp	ala	arg	ala	thr	phe	tyr	240	gly
		ala	gln	cys	ser	leu	cys	thr	ser	leu	250	leu	trp		
50		ser	val	gly	arg	arg	gly	leu							

55 Mutant or variant strains of *Pseudomonas putida* ATCC 53522 may be obtained by environmental selection pressure techniques, by UV irradiation, or by the use of mutagenic chemicals, as will be exemplified hereinafter.

They may also be produced by genetic manipulation techniques, for example by the transfer of plasmid DNA to a multicopy host or by the excision of the chromosomal genes coding for the lipase from the cells of a lipase producing bacteria, followed by the cloning of said genes into a suitable vector molecule.

Modified enzymes of the present invention encompass such mutant, variant or cloned strains with retained, altered or enhanced ability to produce the lipase.

Figure 1 is a map of the 4.3 kb EcoRI fragment of pSNE4. The crosshatched box represents the signal peptide codons (codons -22 to +1), and the stippled region indicates the coding region for the mature Lipase 1 polypeptide codons +1 to +258. The postulated disulfide bonds are shown. The scale is in base pairs (bp). The region sequenced (an SphI fragment of 1363 bp) is indicated with a double arrow. The ATG initiation codon and TAA stop codon are also marked.

The cloning and expression of Lipase 1 illustrated by Example 9 is described herein since a preferred means for carrying out production of the reference enzyme is by cloning, and surprisingly high yields have been obtained by following the Example 9 procedure.

Lipase 1 has excellent hydrolytic activity and produces peracid from the substrate in the presence of a peroxide source, despite the hostile, oxidizing environment. It produces peracid even in the presence of anionic surfactants, which typically inhibit the activity of enzymes. Further, Lipase 1 has a higher ratio of peracid/acid (that is, the reciprocal of the acid/peracid ratio also previously discussed) than does a commercially available enzyme such as Lipase CES.

Lipase 1 may be obtained and used as a crude preparation from the fermentation of P. putida, but preferably is separated from other proteins and purified by means known to the art, such as by ion exchange and gel permeation chromatography, to yield substantially enzymatically pure Lipase 1. This is primarily because the crude fermentation broth of P. putida was found to include another enzyme (hereinafter "Lipase 2") in addition to Lipase 1.

The two enzymes, Lipase 1 and Lipase 2, may be separated by means known to the art such as chromatography. They can be distinguished by their different hydrolysis rates for p-nitrophenyl butyrate and p-nitrophenyl caprylate. Lipase 1 may also be produced by cloning to express this enzyme through a host organism, such as E. coli, followed by octyl sepharose chromatography of the cloned Lipase 1, as is more particularly described hereinafter.

Lipase 2 also hydrolyzes glyceride substrates, and may be used in applications such as in fats and oils processing as a digestive aid.

Preferred modified enzymes of the present invention have comparable or improved efficiency in producing peracid than does the reference enzyme. The ratio of acid/peracid (meq/meq) is an indication of the efficiency of the enzyme for producing peracid. Lower ratios usually mean more desirable, high productions of peracid. Enzymes with ratios equal to 1 yield the highest (about 50%) conversion of substrate to peracid within about 14 minutes. As will be more fully illustrated in the examples, Lipase 1 has been experimentally tested with acid/peracid ratios of about 4-5. Preferred modified enzymes in accordance with the invention have been prepared with acid/peracid ratios from about 1 to about 4-5. Particularly preferred modified enzymes have been tested with acid/peracid ratios of 1-3.

These particularly preferred modified enzymes have one or two amino acids that are different from the Lipase 1 enzyme. One particularly preferred embodiment has serine (instead of glutamine) at position 127 and has asparagine (instead of threonine) at position 205. This one particularly preferred embodiment (sometimes designated "Ser-127/Asn-205") maintains a good acid/peracid ratio. Another particularly preferred modified enzyme has asparagine at position 205 and threonine at position 207. This modified enzyme has good specific activity and maintains the acid/peracid ratio. Yet another particularly preferred modified enzyme has asparagine at position 205. This modified enzyme has a good acid/peracid ratio at a low enzyme concentration. Yet another particularly preferred modified enzyme has glutamine at position 205. This modified enzyme gives substantially equivalent yields of peracid as the Lipase 1 type enzyme yet at lower or equivalent enzyme concentrations. Yet other particularly preferred modified enzymes with excellent acid/peracid ratios are: Ser-127/Thr-205, Thr-127/Gln-205, Asn-127/Thr-207, Thr-127/Asn-205, and Arg-127/Ala-207.

As will be seen, these amino acid modifications are all within about 15 angstroms of the normal serine 126, aspartic acid 176 or histidine 206 with respect to the tertiary structure of the reference enzyme. If the crystal structure is not available to determine modifications within the 15 angstrom location, then another way of describing this location in which amino acids of the reference enzyme can be changed is where at least one amino acid change occurs within about six amino acids on either side of serine 126, aspartic acid 176 or histidine 206 with respect to the primary structure of the reference enzyme.

These 3 amino acid positions (126, 176 and 206) of both the reference enzyme and modified enzymes of the invention are believed to be directly involved in amide and ester hydrolysis, and may sometimes be referred to as a "catalytic triad". The catalytic triad may, in fact, be a "catalytic tetrad" because a crystal structure analysis indicates that serine 214 may be within hydrogen bonding distance of aspartic acid 102. As a consequence, modified enzymes of the invention may further differ from the reference enzyme within

the "modification zone" on either side of serine 214.

As will be understood, modified enzymes having hydrolase activity and an amino acid sequence substantially corresponding to the reference enzyme, that is Lipase 1, may be obtained and used in a manner analogous to that described for Lipase 1. As a consequence, preparations, purifications and experimental data showing properties of the reference enzyme will now be described, and then will be followed by a description of preparations for modified enzymes in accordance with the invention.

The use of emulsifiers or surfactants is generally desirable as in other peracid bleach products. The use of emulsifiers is believed to be of particular value in establishing and maintaining a phase interface promoting interaction between the enzyme and glyceride substrate. Emulsifiers or surfactants can similarly be of value in establishing and maintaining the enzyme and substrate within the aqueous phase.

Anionic surfactants (generally also present in commercially available detergents) may be employed. Examples of such anionic surfactants include ammonium, substituted ammonium (for example, mono-, di-, and triethanolammonium), alkali metal and alkaline earth metal salts of C₆-C₁₈ fatty acids and resin acids, linear and branched alkyl benzene sulfonates, alkyl sulfates, alkyl ether sulfates, alkane sulfonates, olefin sulfonates, hydroxyalkane sulfonates, acyl sarcosinates and acyl N-methyltaurides.

Nonionic surfactants are also suitable for use within the enzyme perhydrolysis system of the invention. Nonionic surfactants include linear ethoxylated alcohols, such as those sold by Shell Chemical Company under the brand name NEODOL. Other nonionic surfactants include various linear ethoxylated alcohols with an average length of from about 6 to 16 carbon atoms and averaging about 2 to 20 moles of ethylene oxide per mole of alcohol; linear and branched, primary and secondary ethoxylated, propoxylated alcohols with an average length of about 6 to 16 carbon atoms and averaging 0 to 10 moles of ethylene oxide and about 1 to 10 moles of propylene oxide per mole of alcohol; linear and branched alkylphenoxy (polyethoxy) alcohols, otherwise known as ethoxylated alkylphenols with an average chain length of 8 to 16 carbon atoms and averaging 1.5 to 30 moles of ethylene oxide per mole of alcohol; and mixtures thereof.

Additional nonionic surfactants include certain block copolymers of propylene oxide and ethylene oxide, block polymers propylene oxide and ethylene oxide with propoxylated ethylene diamine, and semi-polar nonionic surfactants such as amine oxides, phosphine oxides, sulfoxides, and their ethoxylated derivatives.

Suitable cationic surfactants include the quaternary ammonium compounds in which typically one of the groups linked to the nitrogen atom is a C₈-C₁₈ alkyl group and the other three groups are short chained alkyl groups which may bear inert substituents such as phenol groups.

Further, suitable amphoteric and zwitterionic surfactants, which may contain an anionic water-solubilizing group, a cationic group and a hydrophobic organic group, include amino carboxylic acids and their salts, amino dicarboxylic acids and their salts, alkylbetaines, alkyl aminopropylbetaines, sulfobetaines, alkyl imidazolinium derivatives, certain quaternary ammonium compounds, certain quaternary ammonium compounds and certain tertiary sulfonium compounds. Other examples of potentially suitable zwitterionic surfactants can be found in Jones, U.S. Patent 4,005,029, at columns 11-15, which are incorporated herein by reference.

Other exemplary emulsifiers include water soluble or dispersible polymers, such as polyvinyl alcohol (PVA), polyvinylpyrrolidone (PVP), methylhydroxypropylcellulose (MHPC), etc. as well as bile and other natural emulsifiers.

Additional adjuncts of a wide variety may be considered for use in combination with the enzymatic perhydrolysis system of the present invention, depending upon the specific application contemplated. For example, the enzymatic perhydrolysis system may be employed or included within a wide variety of cleanser applications or formulations such as straight bleach products, prewash products (which are often in liquid form) and even various hard surface cleansers.

For liquid formulations, it may be convenient to keep the hydrogen peroxide source separate from either the substrate or the enzyme, and preferably, from both. This could be accomplished by using a multiple chambered dispenser, such as that disclosed in U.S. Patent 4,585,150, issued April 29, 1986, to Beacham et al., and commonly assigned to The Clorox Company.

Suitable adjuncts may include fragrances, dyes, builders, stabilizers, buffers, etc. Stabilizers may be included to achieve a number of purposes. For example, the stabilizers may be directed toward establishing and maintaining effectiveness of the enzyme for original formulation components or even intermediate products existing after the formulation is placed in an aqueous solution. Since enzymes may be hindered in hydrolysis of the substrates because of heavy metals, organic compounds, etc., for example, suitable stabilizers which are generally known in the prior art may be employed to counter such effects and achieve maximum effectiveness of the enzymes within the formulations.

The preferred pH level for aqueous solutions in which the enzymatic perhydrolysis system is dissolved is about 8-11, more preferably about 9-10. Buffering agents can be utilized in the invention to maintain the

desired alkaline pH level for the aqueous solutions. Buffering agents generally include all such materials which are well known to those skilled in the detergent art. In particular, buffering agents contemplated for use in the present invention include, but are not limited to, carbonates, phosphates, silicates, borates and hydroxides.

5 The following experimental methods, materials and results are described for purposes of illustrating the present invention. However, other aspects, advantages and modifications within the scope of the invention will be apparent to those skilled in the art to which the invention pertains.

10 Experimental

15 Example 1

(A) Seeding and Fermenting

20 A seed medium was prepared with 0.6% nutrient broth (Difco) and 1% glucose (pH 6.5). 100 ml of this medium was sterilized in 500 ml fernbach flasks. The flasks were each seeded with a loopful from an overnight culture of *P. putida* ATCC 53552 grown on nutrient agar, and placed on a Newbrunswick shaker at 250 rpm, 37° C for 12 hours. The incubated 12-hour culture was then seeded at appropriate volumes (1=10% v/v) into a 1 liter fermenter (250 ml working volume), a 15 liter Biolaftite fermenter (12 liters
25 working volume), or a 100 liter Biolaftite fermenter provided with a temperature controller, RPM, airflow and pressure controller. The fermenter medium contained 0.6% nutrient broth (Difco), 0.3% apple cutin, and 0.2% yeast extract (Difco), with an initial pH of 6.5. The medium was adjusted to pH 6.8 and sterilized for 40 minutes before seeding. Bacterial growth and enzyme production were allowed to continue in the fermenter for 12-15 hours.

30

(B) Enzyme Recovery by Microfiltration

35 The crude fermentation culture was first filtered in a Amicon unit outfitted with two Romicon microporous membranes (0.22 μ) to remove cells. Remaining enzyme in the retentate which was bound to the cutin particles was removed by centrifugation. Total recovery approached 90%.

(C) Concentration and Dialysis of Whole Cell Filtrate

40

The recovered filtrate from the Amicon unit was concentrated to a volume of 3 liters on an Amicon ultrafiltration unit with two Romicon Pm 10 modules. The concentrated material was then dialysed with 20 liters of 0.01M phosphate buffer, pH 7.5, to remove salts and color. Recovery at this stage averaged about 80%. Total activity for this crude preparation was 8.68×10^6 units. A unit of lipase activity is defined as the
45 amount of enzyme which results in an increase of absorbance at 415 nm of 1.0/minute when incubated at 25° C with 2.0 mM p-nitrophenylbutyrate in 0.1 M pH 8.0 Tris-HCl buffer containing 0.1 wt. % Triton X-100.

50

Example 2

Lipase Activity After Ultrafiltration and Diafiltration

55 The binding of three p-nitrophenyl substrates and the turnover kinetics were studied for the crude preparation of Example 1(C), where reaction conditions were 0.1M Tris with 0.1 wt. % Triton X-100, pH 8.0, at 25° C. The substrates were p-nitrophenyl caprylate, p-nitrophenyl laurate, and p-nitrophenyl palmitate, and the data is set out in Table 1.

Table 1

Substrate	$K_m(\mu M)$	$V_{max}(\mu mole/min/mg \text{ protein})$
PNPC	214	802
PNPL	167	214
PNPP	183	112

The Example 1(C) preparation was used in a variety of experiments, further described below, which showed utility with the enzymatic perhydrolysis system of the invention; however, the Example 1(C) preparation includes two enzymes designated "Lipase 1" and "Lipase 2". Lipase 1 is the better perhydrolyase, and particularly preferred embodiments of the invention utilize substantially enzymatically pure preparations of Lipase 1. A separation and purification of the crude Example 1(C) preparation is described in Example 3, a complete separation of Lipase 1 and Lipase 2 is described in Example 4 (preferred to obtain substantially enzymatically pure Lipase 1), and an extremely pure sample of Lipase 1 preparation (i.e. analytically pure for sequencing) is described in Example 5.

Example 3

Partial Purification of Lipase 1 and Lipase 2 by Ion Exchange and Gel Permeation Chromatography

Lipase 1 was initially partially purified from *Pseudomonas putida* fermentation broth by DEAE Sephacryl chromatography followed by Sephadex G-100 gel permeation chromatography. A DEAE column was equilibrated in 10 mM sodium phosphate buffer, pH 8, and the crude protein was applied to the column in the same buffer. PNB (p-nitrophenyl butyrate) hydrolase activity that was not bound to the column was associated with Lipase 1. Lipase 1 thus obtained from the DEAE step was subjected to chromatography on Sephadex G-100 in 10 mM sodium phosphate buffer pH 8. Lipase 1 eluted from this column as a discrete peak, and was identified by PNB hydrolase activity as well as perhydrolytic activity.

Example 4

Complete Separation of Lipase 1 and Lipase 2 by Hydrophobic Chromatography

Lipase 1 may be separated completely from Lipase 2 by chromatography on hydrophobic resins. The enzyme solution of Example 1(C) after ultrafiltration and diafiltration was adjusted to 0.5M NaCl and applied to a 0.8 x 7 cm octyl Sepharose column equilibrated in 10mM Tris(Cl) pH 8, 0.5M NaCl and washed to remove unbound protein. The following washes were then employed: 10mM Tris(Cl), pH 8, 2M urea; 10mM Na phosphate pH 8; 10mM phosphate, pH 8, 0.5M NaCl. After washing, the column was then developed with a linear gradient to 50% n-propanol. The column fractions were then assayed for activity on p-nitrophenyl butyrate (PNB) and p-nitrophenyl caprylate (PNC) in order to locate the lipase activities. Two lipases were clearly resolved, fraction 32 with a PNB/PNC ratio of 4.6 and fraction 51 with a PNB/PNC ratio of 1.40. These have been designated Lipase 1 and Lipase 2, respectively.

The fractions from this column were further analyzed by SDS gel electrophoresis. This analysis revealed that the two lipase activities track with 30,000 molecular weight bands characteristic of procaryotic lipases; in addition, Lipase 2 migrated as a doublet, and was clearly resolved from the single band of Lipase 1. Prior to sequence analysis, these two partially purified enzymes were separated from the high and low molecular weight contaminants by reverse phase chromatography.

Example 55 Purification of Lipase 1 by HPLC in Preparation for Enzyme Peptide Fragmentation

Prior to sequence analysis, the partially purified material of Example 3 was further purified by chromatography on a 4.8 x 100 mm, SynChromPak C4 reverse phase HPLC column. The system was
 10 equilibrated in 0.05% triethylamine (TEA) and 0.05% trifluoroacetic acid (TFA) (Solvent A) at 0.5 mL/min. 100µg to 1 mg of Lipase 1 was injected onto the column and the protein eluted at 0.5 mL/min with a compound gradient of Solvent A and n-propanol containing 0.05% TEA and 0.05% TFA (Solvent B) B/minute. A typical gradient was +5% from 0 to 20%B and then +0.5% B/minute to 60% B. All lipase is
 15 inactivated by this HPLC solvent system. The protein peaks eluting at about 35% Solvent B (Lipase 1) or at about 39% Solvent B (Lipase 2) were collected and used for further sequence analysis and preparation of CNBr fragments.

Example 6

20

Preparation and Purification of Cyanogen Bromide Peptide Fragments for Amino Acid Analysis

25

The cyanogen bromide peptide fragments for amino acid sequence analysis were prepared and purified as follows. An aliquot of pooled Lipase 1 of Example 5 was dried in a SpeedVac centrifuge and then resuspended to 10 mg/mL in 8 M urea, 88% formic acid. The solution was mixed with one volume of 200
 30 mg/mL CNBr in formic acid and incubated in the dark at room temperature for 2 hours. The product was then desalted into 40% solvent B:50% solvent A (see above) on a 0.8 x 7 cm IBF-TrisAcryl GF05 (coarse) column prior to reverse phase analysis. The peptides were initially separated using the same protocol as listed above for the purification of Lipase 1 by reverse phase. Solvent B, however, was changed to 35%
 propanol:65% acetonitrile (containing TEA and TFA). The initial digest and the peaks after chromatography were also analyzed on SDS/urea/pyridine gels followed by silver staining.

35 Two peaks were chosen from the chromatogram and subjected to rechromatography employing the conditions dictated above, this time on a 0.48 x 25 cm SynChromPak C4 column. After rechromatography, the purified peptides were held for sequence analysis.

40

Example 7Distinction of Lipase 1 from Lipase 2: Preparation of Cyanogen Bromide Fragments of Lipase 1 and Lipase 2

45

The purified fractions of Lipase 1 and Lipase 2 from the octyl Sepharose column (as in Example 4) were each diluted with 3 volumes of solvent A (0.05% triethylamine and 0.05% trifluoroacetic acid) and chromatographed (as in Example 5). As described in Example 4, the purified proteins were analyzed by
 50 SDS gel electrophoresis, and then pooled individually for comparison of the CNBr fragments and the N-terminal amino acid sequences of Lipase 1 and Lipase 2.

Example 8

55

Specific Activity of Lipase 1

The specific activity of Lipase 1 was determined using the enzyme purified as in Example 4. Substantially enzymatically pure Lipase 1 has a specific enzyme activity of 3750 units per mg protein as defined in Example 1(C).

Example 9

10

Preparation of Cloned Lipase 1 in E. Coli Cloning of the Lipase 1 Gene of Pseudomonas Putida

15 The *Pseudomonas putida* strain (ATCC 53552) was grown overnight at 37° C in 200 ml LB (Luria Broth) medium. Cells were harvested by centrifugation and high molecular weight total DNA was prepared exactly according to a standard procedure as outlined by Birnboim et al., *Nucleic Acids Res.* 7, pp. 1513-1523 (1979). The DNA was digested to completion with *EcoRI* and ligated with T4 DNA ligase to a preparation of plasmid pBR322 (ATCC 37017) digested with *EcoRI* and dephosphorylated with bacterial alkaline 20 phosphatase. All enzymes used for the manipulation of DNA were used according to the manufacturers' directions (New England Biolabs or Bethesda Research Laboratories). The ligated DNA was used to transform *E. coli* 294 (ATCC 31445) and ampicillin resistant (Amp^r) colonies were selected. Accordingly, approximately 2 x 10⁴ transformants were obtained (approximately 5 x 10³/plate). Plates were flooded with a solution of 4-methylumbelliferylbutyrate (10mM in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0) and then illuminated with an 25 ultraviolet lamp (wavelength 340 nm). Colonies which hydrolyzed the substrate to release the highly fluorogenic compound 4-methylumbelliferone appeared as intensely blue. Using this method 13 positive colonies were obtained. From each of these positive colonies a plasmid miniprep was prepared by the alkaline lysis method as described in Birnboim, *supra*. Each plasmid was digested with *EcoRI* and resulting fragments were resolved by polyacrylamide gel electrophoresis as described by Maniatis et al., *Molecular* 30 *Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring, New York (1982). Most plasmids contained a single inserted fragment of 4.3 kb. The others contained other fragments in addition to this fragment. This result suggested that all positive colonies arose as a result of the expression of a common cloned gene contained on the 4.3 kb fragment. One of the plasmids which contained only the 4.3 kb fragment, designated pSNE4, was selected for detailed analysis.

35 Plasmid pSNE4 was digested with a variety of restriction enzymes which have 6 bp recognition sequences. These enzymes were used singly or in pairs. Analysis of the fragment sizes resulting from these experiments allowed the generation of a preliminary restriction endonuclease cleavage map of the 4.3 kb *EcoRI* insert of pSNE4. This map is shown in Figure 1.

40 Several subfragments of the *EcoRI* insert of plasmid pSNE4 which were at least 840 bp were subcloned into pBR322 in order to see if any contained a functional gene. Among the plasmids which were found to contain functional lipase genes was pSNES1, which contains a 2.3 kb *EcoRI/SalI* fragment from the *EcoRI* insert of pSNE4. (See Figure 1 for map location of this fragment.)

45 The inserted fragment of pSNES1 was digested with further restriction enzymes and the resulting small fragments were subcloned into bacteriophage M13 vectors, described by Roberts, *Nucleic Acids Res.*, 12, supplement r167-r204 (1984), for sequencing by the dideoxy chain termination method of Sanger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, pp. 5463-5467 (1977). The sequence of the 1.36 kb of DNA between the *SphI* sites (refer to Figure 1), when translated in all possible reading frames, revealed a large open reading frame which includes the NH₂-terminal amino acid residues of the protein as determined by direct amino acid sequencing (residues 1-16). This open reading frame also contains the code for two other directly 50 sequenced peptides (residues 94-105 and residues 173-190). The methionine at position -22 is believed to be the initiation codon because it begins the code for a highly hydrophobic region typical of signal peptides. This signal peptide is presumably cleaved off during the secretion process after the alanine at position -1. The open reading frame ends at position 259, indicating that the encoded mature protein has 258 residues.

55

Regulated Expression of *P. putida* Lipase 1 Gene in *E. coli*

In order to achieve the regulated expression of the *P. putida* lipase gene in *E. coli*, an *XbaI* site was first

introduced just before the ATG initiation codon by site directed mutagenesis, Adelman et al., DNA 2, pp. 183-193 (1983) in bacteriophage M13, and the modified gene was subsequently cloned into an expression vector which contains the strong tacII promoter, deBoer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, p. 2125 (1983). This was done by first digesting pSNES1 with SphI.

5 The 2.4 kb SphI fragment containing the entire lipase coding sequence was isolated and ligated into the replicative form (RF) of M13mp19 at its SphI site and the mixture was used to transfect E. coli JM101 (ATCC 33876). Clear plaques were picked and the bacteriophage (template) DNA in which the SphI fragment was present in a counterclockwise orientation was prepared. A partially complementary single-stranded fragment of DNA consisting of 50 nucleotides was synthesized which contained an Xba site immediately 5' of the Lipase 1 ATG initiation codon. This 50-mer complements the template DNA from the -27 nucleotide position (before the ATG initiation codon) to the -9 position and from the +1 (the A of the ATG) to the +20 position. Between the -9 and the +1 positions, however, the sequence 5'-AACCTTCG-3' of the native lipase promoter region was to be changed to 5'-TATCTAGAATT-3' of the tacII promoter. Mutagenesis was performed.

15 Three hundred plaques were screened by hybridization with a ³²P-labeled synthetic oligonucleotide (5'-ATGAGGTATCTAGAATTATG-3') which spans the area of change. An RF of a positively hybridizing clone was prepared and cleaved with XbaI and SphI. A 1 kb XbaI/SphI fragment containing the gene was isolated and ligated into a vector obtained by digesting pGH907tacII, described by deBoer, supra, with XbaI and SphI and isolating a 4.1 kb XbaI/SphI fragment containing the tacII promoter, and the ampicillin resistance gene. JM101 cells were then transformed with the ligation mixture. An ampicillin resistant colony (containing plasmid pSNTacII--see Figure 2) was selected.

To determine the levels of cloned Lipase 1 synthesized by E. coli, JM101/pSNTacII was grown in 20 mls LB medium supplement with 1mM isopropyl-B-D-thiogalactoside (IPTG) for 10h at 37° C. 294/pBR322 was used as a negative control. The cells were separated from the culture supernatant by centrifugation and then fractionated into periplasmic and membrane/cytoplasmic components, Koshland, supra. Each fraction was tested for activity by p-nitrophenylbutyrate hydrolysis. β-lactamase (periplasmic marker) and β-galactosidase (cytoplasmic marker) were also measured, Gray et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, pp. 2645-2649 (1984), in order to confirm the effectiveness of the cell fractionation procedure. Most of the Lipase 1 activity (74%) was present in the culture supernatant. Most of the cell associated enzyme was found in the cell wash fraction (17% of the total) with smaller amounts present in the periplasmic (2%) and cytoplasm/membrane (7%) fractions. No Lipase 1 activity was present in any fractions of the 294/pBR322 negative control culture.

Broth from the fermentation of E. coli strain JM101 harboring the plasmid pSNTacII was adjusted to 0.5M NaCl and purified by octyl Sepharose substantially as described when P. putida is fermented (Example 4), except the propanol gradient was eliminated and elution was achieved with 20% acetonitrile in 10mM Na phosphate, pH 8, 0.5M NaCl. The isolated product (cloned from the gene expressing the enzyme) was analyzed by SDS gels and migrated identically to the Lipase 1 product isolated from the original Pseudomonas putida strain.

Example 10

Preparation of Cyanogen Bromide Fragments from Cloned Lipase 1

Cyanogen bromide fragments from cloned Lipase 1 were prepared as follows. The product from the octyl Sepharose purification of cloned product (Example 9) was diluted with 3 volumes of solvent A and purified on the short C4 HPLC column, as described for Lipase 1 and Lipase 2 isolated from Pseudomonas putida. The product was analyzed on SDS gel.

Example 11

Comparison of CNBr Fragments of Lipase 1 from P. putida and CNBr Fragments from the Cloned Lipase 1 in E.

coli

5 CNBr fragments of Lipase 1 from *P. putida* and CNBr fragments from the cloned Lipase 1 in *E. coli* were compared. HPLC purified Lipase 1 and 2 from *Pseudomonas* and the cloned Lipase 1 were each hydrolyzed by CNBr as described in Example 6 above. The products were analyzed by SDS/urea/pyridine electrophoresis. The results indicate the cloned protein is clearly Lipase 1. Lipase 1 isolated from *P. putida* (as in Examples 4-5) was shown to be identical to the cloned Lipase 1 isolated from *E. coli* by the following criteria: (a) Lipase 1 from either organism was isolated by the same chromatographic procedure (as in 10 Example 4); (b) the amino acid sequences of the N-terminal of the Lipase 1 isolated from either organism were the same; (c) the CNBr fragment pattern showed that the Lipase 1 and Lipase 2 are clearly distinguished and that the CNBr fragments of Lipase 1 from either *P. putida* or *E. coli* are identical; (d) the p-nitrophenyl butyrate and p-nitrophenylcaprylate substrate activity ratio of Lipase 1 from both bacterial sources is the same; and (e) the hydrolysis/perhydrolysis ratio with tricaprylin as substrate is the same for 15 Lipase 1 as isolated from both organisms.

Example 12

20

Assay for Peroxid Generation

25 An assay was developed for determining peracid generation by monitoring the oxidation of o-phenylene diamine ("OPD"). The oxidation of OPD by peracid is much quicker than by H_2O_2 , and results in an absorbance increase at 458 nm. The assay procedure was to withdraw 0.1 ml of the reaction mixture being tested, to add 0.2 ml OPD solution (although in some instances, the OPD was added to the initial reaction mixture), incubate at room temperature for 5 minutes, add 0.9 ml $CHCl_3/CH_3OH$ (1/1 v/v), centrifuge 1 30 minute, and read the absorbance at 458 nm. The standard plot (for C8 peracid) was linear up to at least 36 ppm peracid.

Example 13 illustrates that a "crude" preparation including the preferred enzyme ("Lipase 1") and the other, but less preferred enzyme ("Lipase 2"), has acceptable hydrolytic activity in the presence of either 30 ppm peroctanoic acid or up to 800 ppm hydrogen peroxide.

35

Example 13

40

Stability of Lipase in the Presence of Hydrogen Peroxide and Peroxid

A quantity of the Example 1 enzyme preparation (including a mixture of Lipase 1 and Lipase 2, as in 45 Example 1(C)), 1 mg/ml, was combined with 0.5 wt. % trioctanoin, 100 mM NaCl, and 10 mM sodium phosphate to form a 2 ml reaction volume with pH 10 for each of five samples. The reaction mixture for each sample was maintained at 30° C. The five samples were tested for hydrolytic activity as follows. One sample had 30 ppm of peroctanoic acid added and the hydrolytic activity of the enzyme was determined (μ mole NaOH/min), as was that of a control (with no peroctanoic acid added). Two other samples had 50 hydrogen peroxide added (400 ppm and 800 ppm, respectively) and the hydrolytic activity determined (μ mole NaOH/min) as was that of a control. Table 2 sets out the data.

55

Table 2

Sample	Added	Hydrolytic Activity (μ mole NaOH/min)
1	(Control) 0 ppm peroctanoic acid	0.48
2	30 ppm peroctanoic acid	0.242
3	(Control) 0 ppm hydrogen peroxide	0.51
4	400 ppm H ₂ O ₂	0.413
5	800 ppm H ₂ O ₂	0.379

As illustrated by Table 2, the hydrolytic activity of this crude enzyme preparation was reduced by the presence of peroctanoic acid and by hydrogen peroxide; however, the enzyme preparation was considered to be sufficiently hydrolytically active despite the hostile, oxidizing environment.

In a similar manner, the same quantity of a commercially available enzyme (K-30) was tested by adding 400 ppm or 800 ppm hydrogen peroxide to reaction volumes of 2 ml, each with 0.5 wt. % trioctanoin, 100 mM NaCl, and 10 mM sodium phosphate. The hydrolytic activity was determined (μ mole NaOH/min), as was that of a control. Table 3 sets out the data for comparison with Table 2.

Table 3

Sample	Added	Hydrolytic Activity (μ mole NaOH/min)
6	(control) 0 ppm H ₂ O ₂	0.223
7	400 ppm H ₂ O ₂	0.135
8	800 ppm H ₂ O ₂	0.056

Comparison of the Tables 2 and 3 data shows that the inventive enzyme is considerably more stable (less sensitive) in the presence of an oxidizing environment than the previously known enzyme.

Example 14A illustrates that a substantially pure preparation of the preferred enzyme (Lipase 1) is not inactivated, and has excellent hydrolytic activity, in the presence of 400 ppm hydrogen peroxide and 4-7 ppm peroctanoic acid generated from the perhydrolysis of trioctanoin. Example 14B illustrates the effect of pH on the perhydrolysis to hydrolysis ratio.

Example 14A

Stability of Lipase 1

Another enzyme preparation as in Example 4 (substantially pure Lipase 1) was tested in both the presence and the absence of hydrogen peroxide. The hydrolysis rate was measured as μ moles/ml/10 min. Each sample had substrate of 1.0 wt. % trioctanoin emulsified with 0.1 wt. % sodium dodecyl sulfate ("SDS"), and Ophenylenediamine (OPD) at 4 mg/ml. The reaction volume for each sample was 2 ml, and the temperature was 27° C. The substantially pure Lipase 1 preparation did not experience any inactivation by the presence of hydrogen peroxide at 400 ppm or from the presence of peracid which was generated due to perhydrolysis.

Example 14B

Effect of pH

An enzyme preparation as in Example 4 was tested under the following constant reaction conditions: 1 wt. % trioctanoin in 0.1 wt. % SDS, 380 ppm H₂O₂, 1 µg/ml enzyme, 2 mg/ml OPD, with a reaction volume of 5 ml at 27° C. Each reaction volume had the pH adjusted to a value between 8 and 11, and the perhydrolysis and hydrolysis values determined as µmole/ml/5 minutes. The optimum pH appears to be about pH 10.

Example 15 shows that the novel enzyme has greater enzymatic reactivity to a lipid than it does to an ester.

Example 15Peracid Generation from Various Substrates

Each sample had 380 ppm H₂O₂, OPD of 2 mg/ml, 1 µg/ml enzyme (including a mixture of Lipase 1 and Lipase 2, prepared as in Example 1), 1 wt. % substrate (as an emulsion with SDS in a substrate/SDS ratio of 10:1) in 40 mM sodium phosphate buffer. The pH was 9.0 (pH stat), the temperature 27° C, and the reaction volume was 5 ml. Table 4 illustrates the data as µmole/ml/10 min.

Table 4

Substrate	Hydrolysis (Acid Production)	Perhydrolysis (Peracid Production)
trioctanoin	4.24	0.42
methyl octanoate	0.66	0.11

As illustrated by the data, the novel enzyme has increased reactivity to the triglyceride substrate (with respect to the simple ester), and is shown to be a lipase.

Many commercially available enzymes are inhibited by the presence of anionic surfactant. Indeed, an anionic surfactant such as SDS is routinely used to solubilize proteins in procedures as SDS electrophoresis by binding to the protein molecules, converting them to rod-like shapes, and masking their native charge with the SDS negative charge. Since many, if not most, commercially available detergents include anionic surfactants, the ability of an enzyme to maintain its hydrolytic activity despite the presence of an anionic surfactant is an important advantage.

Example 16 illustrates the retention of hydrolytic activity by an enzyme in accordance with the invention in the presence of anionic surfactant, and the inhibition of activity by a commercially available enzyme for comparison.

Example 16Comparison of Activities of Lipase 1 and Lipase K-30 in the Presence of Anionic Surfactants

Samples were prepared having the same composition and/or reaction conditions except for the particular enzyme. Comparison samples were prepared with the commercially available enzyme Lipase K-30, said to be obtained from *Aspergillus niger*, available from Amano, at 8.7 µg/ml. The inventive enzyme preparation was as in Example 1 at 16.8 µg/ml (to approximate the hydrolysis rate of Lipase K-30). Each sample had trioctanoin as an emulsion with SDS in a weight ratio of 10:1. Sodium phosphate buffer (10 mM)

was present, the pH was 10, the temperature was 25° C, and the reaction volume for each same was 2 ml. The data showing trioctanoin hydrolysis for each enzyme in the presence of SDS is set out in Table 5.

Table 5

Amounts of Substrate (wt. %)	Substrate Hydrolysis (μ l 0.1N NaOH/min)
With Inventive Enzyme:	
0.01	2
0.05	7
0.1	11
0.5	13
1.0	12
Amounts of Substrate (wt. %)	Substrate Hydrolysis (μ l 0.1N NaOH/min)
With Commercially Available Enzyme:	
0.01	1
0.05	7
0.1	7.5
0.5	3
1.0	1.5

As can be seen by the data of Table 5, the two different enzymes provide about comparable hydrolysis at 0.05 wt. % substrate, but the commercially available enzyme was inhibited by the increasing amount of SDS when the substrate amount increased beyond about 0.1 wt. % trioctanoin. That is, the perhydrolysis rate was relatively poor for Lipase K-30. By contrast, the inventive enzyme was substantially unaffected by the presence of the anionic surfactant.

In tests analogous to Example 16, but with emulsifier (polyvinyl alcohol), both the commercially available Lipase K-30 and the inventive enzyme exhibited good hydrolytic rates.

Example 17

Comparative Enzymatic Peracid Generation

Peracid generation was determined for an enzyme preparation as in Example 3, and compared with the peracid generation of two commercially available enzymes in the presence of 0.5 wt. % SDS. Each test sample had 480 ppm hydrogen peroxide, enzyme at 6 μ g/ml, trioctanoin substrate at 5 wt. % and 0.5 wt. % SDS. The constant pH was 10 and the temperature was 25° C. Table 6 sets out the perhydrolysis profile of the inventive enzyme.

Table 6

time (min)	peracid generated (ppm)
2	3.9
4	7.2
6	8.1
8	9.0
10	9.9

By contrast, the amount of peracid generated with commercially available Lipase CES (said to be derived from *Pseudomonas fl.*, available from Amano) remained substantially constant and low (about 0.5 ppm peracid), while the amount of peracid with commercially available Lipase K remains substantially constant and even lower (about 0.3 ppm peracid).

The ratio of perhydrolysis to hydrolysis is very important. One wishes the highest possible conversion to peracid from substrate. The inventive enzyme has a higher ratio of peracid/acid than a commercially available enzyme such as Lipase CES. This means the inventive enzyme more efficiently utilizes its substrate for peracid generation and thus less of the substrate need be present in bleaching formulations.

Example 18

Comparison of Perhydrolysis and Hydrolysis Activities of Lipase 1 and Currently Available Commercial Lipase

Perhydrolysis and hydrolysis were measured in samples containing 400 ppm hydrogen peroxide, 0.12 M HPO_4^{2-} , pH 10.0, and at various concentrations of either a commercially available lipase (CES from Amano) or the inventive enzyme (from Example 1(C) preparation). Perhydrolysis was measured by thiosulfate titration at 14 min. of reaction. Hydrolysis was measured simultaneously by continuous titration using the pH stat. The quantity of substrate was 12.5 wt. % trioctanoin with 0.75 wt. % PVA. The inventive enzyme provided more peracid for a lower substrate hydrolysis, which showed it more efficiently utilized the substrate than did the Lipase CES.

The crude preparation illustrated by Example 1(C) has been discovered to include two enzymes designated "Lipase 1" and "Lipase 2". The perhydrolysis to hydrolysis ratio of one with respect to the other for trioctanoin substrate is different, and Lipase 1 is the better perhydrolyase when compared to Lipase 2. Example 19 illustrates these ratios.

Example 19

Effect of Surfactants on the Hydrolytic and Perhydrolytic Activities of Lipase 1 and Lipase 2

Four samples were prepared, and each contained 1 wt. % substrate, 0.1 wt. % surfactant (either SDS or PVA), 400 ppm H_2O_2 , and 4 mg/ml OPD. The reaction volumes were 2 ml, pH 9.0, and temperature 27° C. Either Lipase 1 (from Example 3 preparation or from Example 9 preparation) or Lipase 2 (from Example 4) was added to the samples. Table 7 sets out the data.

Table 7

Surfactant	Lipase 1 (p-nitrophenyl butyrate hydrolysis units)	Lipase 2 (p-nitrophenyl butyrate hydrolysis units)	Perhydrolysis to Hydrolysis Ratio
SDS	4	0	0.19
PVA	4	0	0.14
SDS	0	20	0.010
PVA	0	20	0.011
SDS	12	0	0.12
PVA	12	0	0.076

As may be seen from the Table 7 data, Lipase 1 is a significantly better perhydrolase for trioctanoin substrate than Lipase 2 in the presence of the anionic surfactant, and is an about comparable perhydrolase in the presence of the nonionic surfactant.

Example 20 illustrates that excess of the novel enzyme appears to provide increased hydrolysis, but with no increase in peracid. Again, this shows an effective utilization of substrate.

Example 20

Effect of Enzyme Concentration Upon the Perhydrolysis/Hydrolysis Ratio

The substrate was 1 wt. % trioctanoin emulsified with 0.1 wt. % SDS, there was 400 ppm hydrogen peroxide, 4 mg/ml OPD, a pH of 9.0, a temperature of 25° C, and a reaction volume of 5 ml. Three different amounts of enzyme (prepared as in Example 4) were utilized, with the results illustrated in Table 8.

Table 8

Enzyme Level (PNB* units/ml)	Hydrolysis (μ mole/ml)	
	5 min	10 min
3	1.7	3.2
6	3.5	5.9
12	6.1	10.1
	Perhydrolysis (μ mole/ml)	
	5 min	10 min
3	0.42	0.54
6	0.51	0.78
12	0.57	0.87

*p-nitrophenyl butyrate hydrolysis

Thus, the perhydrolysis to hydrolysis ratios after 5 minutes were 0.25, 0.15 and 0.09, respectively, and after 10 minutes were 0.17, 0.13 and 0.09, respectively. The smaller amount of enzyme was thus more efficient.

When separated, Lipase 1 and Lipase 2 were found to have quite different hydrolysis rates (hydrolytic activity) for p-nitrophenyl butyrate and for p-nitrophenyl caprylate. Thus, the two novel enzymes can be distinguished by their ratios of p-nitrophenyl butyrate to p-nitrophenyl caprylate hydrolysis, as illustrated by

Example 21.

Example 21

5

Hydrolysis Rates of Lipase 1 and Lipase 2 with p-Nitrophenyl Butyrate and p-Nitrophenyl Caprylate as Substrates

10

The reactions were performed in samples containing 0.1 M Tris HCl, pH 8.0 with 0.1 wt. % Triton X-100 nonionic surfactant (available from Rohm & Haas) at 25° C. The hydrolysis rates of 2.0 mM p-nitrophenyl butyrate (PNB) for Lipase 1 (as from Example 3), was 0.60 (OD 415 nm/min.), while that of 2.0 mM p-nitrophenyl caprylate (PNC) was 0.09, for a PNB/PNC ratio of 7. By contrast, the hydrolysis rate of PNB for

15

Lipase 2 at the same concentration was 0.54, of PNC at the same concentration was 0.44, for a PNB/PNC ratio of 1.

The reference enzyme has been shown to produce peracid in the presence of a broad range of surfactants even under hostile conditions for commercially available enzymes, such as the presence of anionic surfactants.

20

Example 22

25

Perhydrolysis Activity of Lipase 1 and With Two Commercially Available Lipases

Samples including either the reference enzyme (as in Example 1(C)), commercially available Lipase K or commercially available Lipase CES were dissolved in an aqueous solution containing a substrate (trioctanoin), hydrogen peroxide, and a mixture of surfactants (anionic and nonionic). The solutions were at room temperature and had a pH of 10.0. Perhydrolysis was calculated as ppm after 14 minutes, as set out in Table 9.

35

Table 9

Enzyme (1 mg/ml)	Detergent* (% w/w)	Trioctanoin:Emulsifier (% w/w)	H ₂ O ₂ (ppm)	Pedrolysis (ppm)
Reference enzyme	0.028	9.5:0	400	4.0
Reference enzyme	0.026	9.5:0.05 (sodium deoxycholate)	400	3.8
Reference enzyme	0.028	9.5:0.15 (sodium deoxycholate)	381	3.4
Reference enzyme	0.028	9.5:0.01 (sodium lauryl sulfonate)	397	3.3
Lipase X	0.028	9.5:0	505	0
Lipase CES	0.028	9.5:0	400	0
Lipase CES	0.026	9.5:6.9 (propylene glycol)	417	0

40

45

*45.1 wt. % CALSOFT F-90 (alkylbenzene sulfonate, available from Pilot Chemical Co.), 40.8 wt. % SLS (sodium lauryl sulfate) and 14.1 wt. % NEODOL 25-7 (C12-C15 alcohol with an average ethoxylation of 7, available from Shell Chemica I)

50

The reference enzyme is thus shown to provide strikingly better perhydrolysis in the presence of detergents including anionic surfactants.

The preceding examples are based on the use of a triglyceride substrate with the functional group (i) of the preferred substrates referred to above. Other glycerides included within that same functional group could be substituted for the triglyceride in the preceding examples. At the same time, additional substrates as defined above, particularly those included within the preferred functional groups of ethoxylated ester (ii)

and propoxylated esters (iii) could be substituted for the triglyceride substrates in the preceding examples.

Further in connection with the preferred functional substrate groups (i), (ii) and (iii) referred to above, specific substrate examples within the first functional group are clearly apparent from the preceding examples.

5 Examples of substrates from the other two groups are demonstrated by the method of synthesis for a propoxylated ester set forth in Example 23.

Example 23

10

The procedure for preparation of a propylene glycol monoester of carboxylic acid includes the following steps:

15 (1) Salt Formation and Dehydration: One equivalent of carboxylic acid and 0.09 equivalents of sodium carbonate were combined in a round bottom flask equipped with a magnetic stir bar and an oil bath for heating. The slurry was heated under vacuum to 150 °C with constant stirring for about one hour to achieve dehydration. The vacuum was released and the reaction cooled to room temperature.

20 (2) Esterification: The cooled acid/acid salt solution from step (1) was combined with about six equivalents of propylene oxide and heated on a warm oil bath at about 60 °C under reflux for approximately eight hours to complete the esterification reaction. (Completion of the esterification reaction was confirmed by G. monitoring).

25 (3) The reflux condensate was removed and excess propylene oxide boiled off. About 200 milliliters of diethyl ether per 100 millimoles of acid were added and the resulting solution extracted in a separatory funnel with two volumes of 5% sodium carbonate. One volume of brine was then added. The ether layer was dried over sodium sulfate, filtered and rotary evaporated to produce the resulting ester product (typically about 90% pure).

Other examples of functionalized substrates according to functional substrate groups (ii) and (iii) can be produced by similar procedures.

Example 24 illustrates stain removal studies of several preferred formulations.

30

Example 24

35 Diagnostic evaluations of oxidant performance were performed with 100% cotton swatches stained with crystal violet as follows. Crystal violet (0.125 g) was added to 1.25 liters of distilled water. One hundred two-inch by two-inch undyed, 100% cotton swatches were added to the solution and agitated for eight hours. The cotton swatches (now dyed with crystal violet) were removed from the staining solution and rinsed repeatedly with cold tap water until the effluent was nearly clear. The stained swatches were then
40 individually placed on aluminum foil, blotted with paper towels, and allowed to air dry.

Three preferred formulations including the reference enzyme were prepared, as were corresponding control compositions. The three reference enzyme compositions and the three corresponding control compositions were each used to wash the stained cotton swatches and the stain removal performance evaluated for each. The performance results are summarized in Table 10.

45

50

55

Table 10

5	<u>Reference Enzyme Composition (a)</u>	<u>% Stain Removal</u>
	0.06 wt. % trioctanoin	63.6
	0.04 wt. % sodium dodecylsulfate	
10	100 ppm H ₂ O ₂	
	1 µg/ml Lipase 1	
	20 µM EDTA	
	(pH = 10.5)	
15	<u>Control Composition (a)</u>	
	0.06 wt. % trioctanoin	50.6
20	0.04 wt. % sodium dodecylsulfate	
	100 ppm H ₂ O ₂	
	20 µM EDTA	
25	(pH = 10.5)	
	<u>Reference Enzyme Composition (b)</u>	
	0.06 wt. % trioctanoin	80.4
30	0.04 wt. % sodium dodecylsulfate	
	200 ppm H ₂ O ₂	
	1 µg/ml Lipase 1	
35	20 µM EDTA	
	(pH = 10.5)	
40	<u>Control Composition (b)</u>	
	0.06 wt. % trioctanoin	69.8
	0.04 wt. % sodium dodecylsulfate	
45	200 ppm H ₂ O ₂	
	20 µM EDTA	
	(pH = 10.5)	

50

55

Table 10 (Continued)Reference Enzyme Composition (c)

5	0.02 wt. % trioctanoin	67.4
	0.02 wt. % sodium dodecylsulfate	
	50 ppm H ₂ O ₂	
	5 µg/ml Lipase 1	
10	20 µM EDTA	
	(pH = 10.5)	

15	<u>Control Composition (c)</u>	
----	--------------------------------	--

	0.02 wt. % trioctanoin	52.2
	0.02 wt. % sodium dodecylsulfate	
	50 ppm H ₂ O ₂	
20	20 µM EDTA	
	(pH = 10.5)	

25 As may be seen from the data of Table 10, the compositions including reference enzyme provided improved stain removal benefits with respect to the control compositions even though the control compositions included the hydrogen peroxide component. These improved stain removals are due to the enzymatic perhydrolysis system and are particularly striking as occurring in the presence of anionic surfactant which inhibits many prior known commercially available enzymes.

30 Perhydrolysis or activated oxidant systems disclosed by various of the preceding examples can be used in combination with any of a wide variety of detergent formulations typically employed in cleaning fabrics. Thus, a typical heavy-duty built powdered detergent for U.S. laundry applications includes anionic and/or non-ionic surfactants, phosphate or non-phosphate builders, buffering agents, and miscellaneous additives such as brighteners, perfume, proteases, and the like. The perhydrolysis system of the present invention may be used by itself or as a minor part of such a typical powdered detergent.

40 Typical heavy-duty built powdered detergents for European conditions have about the same nominal compositions as the U.S. counterparts, but product use concentrations are usually as 1.2% solutions in the washing machines (rather than the about 0.15% solutions typical in United States practice). A preferred formulation for the inventive perhydrolysis system packaged in combination with a typical detergent formulation is from about 3-30 wt. % source of peroxygen, about 0.6 to about 12 wt. % substrate, and about 0.001 to about 0.7 wt. % modified enzyme.

45 Under typical United States laundry use (where the detergent is usually free of oxidative bleaches and enzymes for stain removal), it is common practice to use a product containing oxidants (typically sodium perborate or sodium percarbonate) and enzymes (proteolytic and amylolytic) in addition to the detergent to improve performance. These oxidant-containing products are usually formulated to deliver about 25-50 ppm A.O. (hydrogen peroxide) at a product use concentration of about 0.17% solution in the washing machine. When the inventive perhydrolysis system is intended for use with detergent in wash water at temperatures from about 70° F to about 100° F, then a preferred formulation preferably has the source of hydrogen peroxide, the substrate, and the modified enzyme in a weight ratio between about 2400:200:1 and 48:20:1. 50 A particularly preferred enzymatic perhydrolysis system of the invention has a weight ratio of sodium perborate tetrahydrate, trioctanoin and modified enzyme 1 in a weight ratio of 95:39:1. Such laundry additive formulations generate about 25-50 ppm A.O. (hydrogen peroxide), 2-20 ppm A.O. (theoretical peracid) and 0.1 ppm to 10 ppm enzyme in the wash solution at a product use concentration of about 0.17%.

55 Example 25 illustrates how specific designated base pair changes were made in the Lipase 1 gene from ATCC 53552 to obtain modified enzymes of the invention.

EXAMPLE 25

Specific designated base pair changes were made in the Lipase 1 gene from ATCC 53552 by the method as described by Carter, *Biochem. J.*, 237, pp. 1-7 (1986). The Eco RI-Sph I fragment from PSN tac II containing the entire Lipase 1 gene plus the tac II promoter was ligated into an M13 MP 18 vector which had been digested with Eco RI and Sph I. DNA sense strands were prepared and used as mutagenesis templates. A synthetic primer containing the desired mutation coding for the amino acid change was annealed to the single stranded template creating a double stranded region with one or more base pair mismatches. Nucleotides and the necessary enzymes were added in order to create double stranded plasmid from the primer and template. The resulting plasmid was transformed into *E. coli* JM101 and colonies were analyzed for the desired nucleotide changes that result in an amino acid change. For example, mutants having amino acid replacements at position 126 (with Ala or Tyr) and position 206 (with Gln) were created by this site-directed mutagenesis method.

Specific designated base pair changes were also made in the Lipase 1 gene that did not result in an amino acid change, but rather created unique endonuclease restriction sites. The method used was as described by Norris et al., *Nucleic Acids Res.*, 11, pp. 5103-5112 (1983) and Wells et al., *Gene*, 34, pp. 315-323 (1985).

Site directed mutagenesis was done in order to create two sets of unique sites on either side of the active serine 126. These changes, which did not affect the amino acid sequence, were AatII-Bam HI. Similarly, unique Bst XI-Bam HI sites were created around the active His 206 site. Each of these sets of mutations was done individually, thus creating two different plasmids with unique sites into which a piece of synthetic DNA or cassette carrying the desired amino acid change(s) can ligated (and exchanged for the wild type Lipase 1 gene). Specific base changes were as follows:

Aat II: CACTTC to GACGTC
 Bam HI: GGCTCG to GGATCC
 Bst XI: CCGGTGTTCTGG to CCAGTGTCTGG
 Bag HI: GGTAGC to GGATCC

In order for the mutagenized Bst XI site to be unique for the His 206 cassettes, a Bst XI site at serine 126 had to be eliminated by changing the serine 126 codon from TCC to TCG.

The plasmid carrying the mutations for the serine cassettes is designated pGClacI3AB, indicating a pBR322 plasmid carrying the tacII promoter and the lipase gene with the unique Aat II-Bam HI sites. The plasmid for the histidine mutants was designated pUC119tacI3BB, indicating a pUC plasmid carrying the tacII promoter and the lipase gene with the unique Bst XI-Bam HI sites.

All mutants with single amino acid changes other than those described above were done in this way. For the generations of random mutants, cassettes containing random base changes were used.

Double mutants were constructed by digesting the plasmid PGC tac II 3AB containing the desired mutation in the amino acid 126 region with Asp 718 and Acc I, and isolating the 300 base pair fragments. A plasmid PUC 119 tac II 3BB with the amino acid change in the 206 region was digested with the same restriction endonucleases and the 300 base pair fragment ligated into the resulting vector.

The enzymes with lipase activity were isolated as follows. Cells were grown for 20 h. at 37°C in two tubes of 5ml LB + carbenicillin (50 µg/ml). Cells were spun down at 6000 rev/min for 8 minutes at 4°C in a Sorvall RC-5B. Each cell pellet was resuspended in 1 ml of cold 20% sucrose, 10 mM NaPi (filter sterilized), and 100 µL of 0.25M EDTA pH 8.0. The suspension was incubated on ice for 10-15 minutes, and then centrifuged at 6000 rev/min for six minutes at 4°C. The supernatant was then assayed for hydrolytic and perhydrolytic activity.

Purification was generally as follows. Fermentation broth was centrifuged at four thousand g for twenty minutes. The supernatant was decanted, and the cell paste frozen to minus seventy degrees centigrade. The cell paste was then thawed, and homogenized in a Waring blender with four volumes of a buffer consisting of 20% sucrose, 10 mM sodium-phosphate, pH 8. After thirty minutes of stirring, polyethylenimine was added to a final concentration of 0.1% and stirred an additional five minutes. The slurry was then centrifuged at four thousand g for twenty minutes. The supernatant was filtered through a 0.22 micron filter; 10 mM sodium-phosphate, pH 8 was added to the supernatant until the conductivity was 2.2 milliohms. The resulting preparation was chromatographed on a sulfoyl-propyl cation exchange resin using 10 mM sodium-phosphate, pH 8. The lipase enzyme was eluted from the resin using 250 mM sodium chloride, 10 mM sodium phosphate, pH 8. At this point, the preparation is greater than ninety-five percent pure, as judged by SDS-PAGE.

The screening method used for detecting better perhydrolyase mutants expressed by the *E. coli* was as

follows. Transformants containing mutagenized DNA were streaked onto 1.2 micron cellulose acetate filters on Luria Agar (LA) + 50 µg/ml Carbenicillin plates to obtain approximately 500 colonies per plate (150 mm petri dishes). Wild type controls were dot inoculated on a small area of each plate and the plates were incubated for 20 hrs. at 37 °C.

- 5 The cellulose acetate filters containing the transformants and wild type controls were then lifted and transferred to fresh LA + Carb plates and stored at 4 °C. The plates from which the filters were lifted were screened for lipase perhydrolysis activity by pouring 18 mls. per plate of an agarose overlay containing:
0.8% agarose in 0.4M NaH₂PO₄, pH 9.5
0.1% Trioctanoir/0.01% SDS

- 10 500 ppm H₂O₂
1 mg/ml o-tolidine.

Positive colonies (indicating perhydrolysis) produced a dark yellow color after 2 hrs. of incubation at room temperature and were selected for by comparison with the wild type controls.

- Each corresponding positive colony was picked from the original filter and inoculated into a well of a 96-
15 well sterile titertek plate containing 100µl of LB + 50 µg/ml Carbenicillin (one column was inoculated with a wild type control). This plate was grown 6-7 hrs. (or overnight). Using a 96-pronged plate stamper, an LA + Carb plate with a cellulose acetate filter and allowed to grow for 20 hrs. at 37 °C. This plate was then rescreened using the overlay procedure described above for selection of the best mutants. Single glycerol stocks were then prepared by picking colonies from the stamped filter and growing in 5 mls. LB 6-7 hrs at
20 37 °C. These glycerol stocks are used for larger scale testing.

From the procedures of preparing and screening described above, a number of modified enzymes having comparable or improved peracid production with respect to the reference enzyme were isolated from *E. coli* colonies with mutant Lipase 1 genes. Table 11 summarizes such modified enzymes of the invention.

25

30

35

40

45

50

55

Table 11

Enzyme ($\mu\text{g/ml}$)	Acid ($\text{meq} \times 10^3$)	Peracid ($\text{meq} \times 10^3$), (ppm)		Ratio A/P
Wild Type(0.4)	17	3.7	3.9	5
(0.8)	26	6.2	6.6	4
(1.5)	51	9.4	9.8	5
Gln-205 (0.3)	9.7	2.8	3.0	3
Gln-205 (0.6)	11	3.9	4.2	3
Thr-207 (0.9)	21	4.5	4.8	5
Pro-205 (1.5)	22	6.4	6.8	4
Lys-205 (2.4)	25	4.8	5.1	3
Ser-127 (20)	5.1	1.3	4.1	4
Gly-207 (2.3)	6	1.4	1.5	4
Trp-207 (0.9)	25	5.6	5.9	4
Lys-207 (0.3)	20	6.7	7.1	3
Asn-205 (0.3)	12	5.3	5.6	2
Asn 205 (0.64)	14	8.7	9.3	2
Asn-205/Thr-207 (0.3)	19	7.4	7.5	3
Glu-205 (0.4)	18	3.9	4.1	5
Cys-205 (0.50)	19	5.8	6.2	3
Arg-127/Thr-207 (30)	23	13	13.4	2
Asn-127/Gln-205 (30)	9.7	4.3	4.6	2
Ser-127/Thr-207 (19)	19	7.9	8.4	2
Ser-127/Asn-205 (8)	13	5.5	5.8	2
Ser-127/Thr-205 (25)	9.4	7.1	7.6	1
Arg-127/Asn-205 (12)	16	9.5	10.1	2
Thr-127/Gln-205 (50)	20	16	16.8	1
Asn-127/Thr-207 (44)	18	14	14.7	1
Thr-127/Asn-205 (20)	14	6.8	7.2	1
Arg-127 (2.6)	14	2.8	3.0	4
Ala-207 (0.2)	13	2.9	3.1	4
Arg-127/Ala-207 (17)	12	9	9	1
Ala-207 (0.2)	13	2.9	3.1	5
Thr-127/Ala-207 (14)	8.6	2.4	2.6	4
Thr-127/Ala-207 (22)	9.7	6.3	6.7	2

The assay condition for determining the ratio of acid to peracid were as follows.

substrate 0.4% tricaprylin

emulsifier 0.04% sodium dodecylsulfate

H_2O_2 800 ppm A.O.

5 μM EDTA

reaction pH 10.0

reaction temperature RT

reaction time 14 minutes

The pH-stat monitors both hydrolysis of tricaprylin to produce caprylic acid and perhydrolysis of tricaprylin to produce peroctanoic acid. Both acid products are titrated by pH stat, as the pKa of peroctanoic acid = 8.5 and the caprylic (octanoic) acid 3.5. The data is acquired off the instrument as total meq product/14 minutes. Peroctanoic acid is quantitatively assayed, after decomposition of H_2O_2 by addition of catalase, on a Brinkman Autotitrator by addition of excess acidified potassium iodide and titration with dilute thiosulfate. It is believed that the EDTA stabilizes the peroctanoic acid by reducing metal-catalyzed decomposition. The peracid titration yields meq peracid which is subtracted from the total acid observed by pH-stat, to yield a net hydrolysis (acid) value.

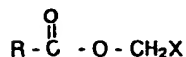
As may be seen from the data of Table 11, a number of modified enzymes with comparable or considerably better efficiency with respect to the reference enzyme have been made.

Claims

1. An enzymatic perhydrolysis system for in situ generation of peracid characterized in that it comprises:

- 5 (a) a modified enzyme having hydrolase activity, the modified enzyme having an amino acid sequence substantially corresponding to such an enzyme isolatable from Pseudomonas putida (ATCC 53552), but differing therefrom by at least one amino acid either:
- (i) within about 15 Å (15×10^{-10} m) of serine 126, aspartic acid 176 or histidine 206 when the modified enzyme is in crystallized form; or
- 10 (ii) within about six amino acids of the primary structure on either side of serine 126, aspartic acid 176 or histidine 206:
- (b) a substrate being capable of hydrolysis by such a modified enzyme; and
- (c) a source of peroxygen which will react with (a) and (b) to produce peracid in the presence of a substrate-solubilizing aqueous solution.

15 2. A system as claimed in claim 1 wherein the substrate has the structure:



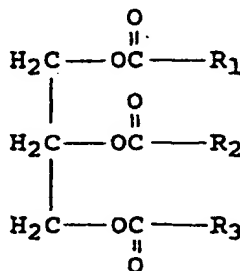
wherein R is a substituent including at least one carbon atom and X is a functional moiety or a hydrocarbon group.

20 3. A system as claimed in claim 2 wherein X comprises a functionalized polyol or polyether; or X includes at least one carbon atom and at least one functional group.

4. A system as claimed in any of claims 1 to 3 wherein the substrate (b) is selected from:

(i) glycerides having the structure:

25

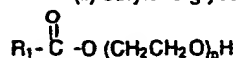


35

wherein R_1 is $\text{C}_1\text{-C}_{12}$, R_2 is $\text{C}_1\text{-C}_{12}$ or H and R_3 is $\text{C}_1\text{-C}_{12}$ or H;

(ii) ethylene glycol derivatives having the structure:

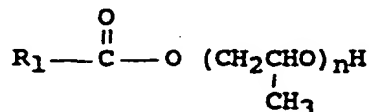
40



wherein $n = 1\text{-}10$ and R_1 is defined as above; and

(iii) propylene glycol derivatives having the structure:

45



50

wherein R_1 and n are defined as above.

5. A system as claimed in claim 4 wherein R_1 is $\text{C}_6\text{-C}_{10}$, R_2 is $\text{C}_6\text{-C}_{10}$ or H and R_3 is $\text{C}_6\text{-C}_{10}$ or H.

6. A system as claimed in any of claims 1 to wherein the substrate (b) is ordinarily incapable of substantial chemical perhydrolysis.

55

7. A system as claimed in any of claims 1 to 6 wherein the substrate is normally insoluble in aqueous solution, and the substrate-solubilizing aqueous solution includes an emulsifying agent.

8. A system as claimed in claim 7 wherein the emulsifier includes: a water-soluble polymer; a cationic, non-ionic, anionic, amphoteric or zwitterionic surfactant; bile salts; or mixtures of any of the foregoing.

9. A system as claimed in any of claims 1 to 7 wherein a buffer is also present, the buffer including a

carbonate, phosphate, silicate, borate, or hydroxide.

10. A system as claimed in any of claims 1 to 9 wherein the substrate (b) includes a triglyceride.

11. A system as claimed in any of claims 1 to 10 wherein the enzyme isolatable from P. putida (ATCC 53552) has the amino acid sequence:

5	1	ala	pro	leu	pro	asp	thr	pro	gly	ala	10	pro	phe
										20			
10		pro	ala	val	ala	asn	phe	asp	arg	ser	gly	pro	
									30				
		tyr	thr	thr	ser	ser	gln	ser	glu	gly	pro	ser	
								40					
		cys	arg	ile	tyr	arg	pro	arg	asp	leu	gly	gln	
							50						
15		gly	gly	val	arg	his	pro	val	ile	leu	trp	gly	
						60							
		asn	gly	thr	gly	ala	gly	pro	ser	thr	tyr	ala	
					70								
		gly	leu	leu	ser	his	trp	ala	ser	his	gly	phe	
20				80									
		val	val	ala	ala	ala	glu	thr	ser	asn	ala	gly	
			90										
		thr	gly	arg	glu	met	leu	ala	cys	leu	asp	tyr	
		100										110	
25		leu	val	arg	glu	asn	asp	thr	pro	tyr	gly	thr	
											120		
		tyr	ser	gly	lys	leu	asn	thr	gly	arg	val	gly	
										130			
		thr	ser	gly	his	ser	gln	gly	gly	gly	gly	ser	
30								140					
		ile	met	ala	gly	gln	asp	thr	arg	val	arg	thr	
								150					
		thr	ala	pro	ile	gln	pro	tyr	thr	leu	gly	leu	
							160						
35		gly	his	asp	ser	ala	ser	gln	arg	arg	gln	gln	
						170							
		gly	pro	met	phe	leu	met	ser	gly	gly	gly	asp	
					180								
		thr	ile	ala	phe	pro	tyr	leu	asn	ala	gln	pro	
40				190									
		val	tyr	arg	arg	ala	asn	val	pro	val	phe	trp	
			200										
		gly	glu	arg	arg	tyr	val	ser	his	phe	glu	pro	
		210									220		
45		val	gly	ser	gly	gly	ala	tyr	arg	gly	pro	ser	
											230		
		thr	ala	trp	phe	arg	phe	gln	leu	met	asp	asp	
										240			
		gln	asp	ala	arg	ala	thr	phe	tyr	gly	ala	gln	
50									250				
		cys	ser	leu	cys	thr	ser	leu	leu	trp	ser	val	
		gly	arg	arg	gly	leu							

55 and the modified enzyme has substantially the same amino acid sequence, but with: glutamine at position 205; asparagine at position 205; asparagine at position 205 and threonine at position 207; serine at position 127 and asparagine at position 205; serine at position 127 and threonine at position 205; threonine at position 127 and glutamine at position 205; asparagine at position 127 and threonine at position 207;

threonine at position 127 and asparagine at 205; or arginine at position 127 and alanine at position 207.

12. A system as claimed in any of claims 1 to 11 wherein the substrate (b) is trioctanoin or tridecanoin.

13. A system as claimed in any of claims 1 to 11 wherein the substrate (b) includes at least one glyceride moiety, preferably being selected from diglycerides and triglycerides.

5 14. A process for bleaching a material characterized in that it comprises contacting the material with an aqueous solution and combining with the aqueous solution an enzymatic perhydrolysis system as claimed in any of claims 1 to 13.

15. A process as claimed in claim 14 wherein an emulsifier is present which is capable of at least maintaining or improving peracid yields achieved by the system in the absence of the emulsifier.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

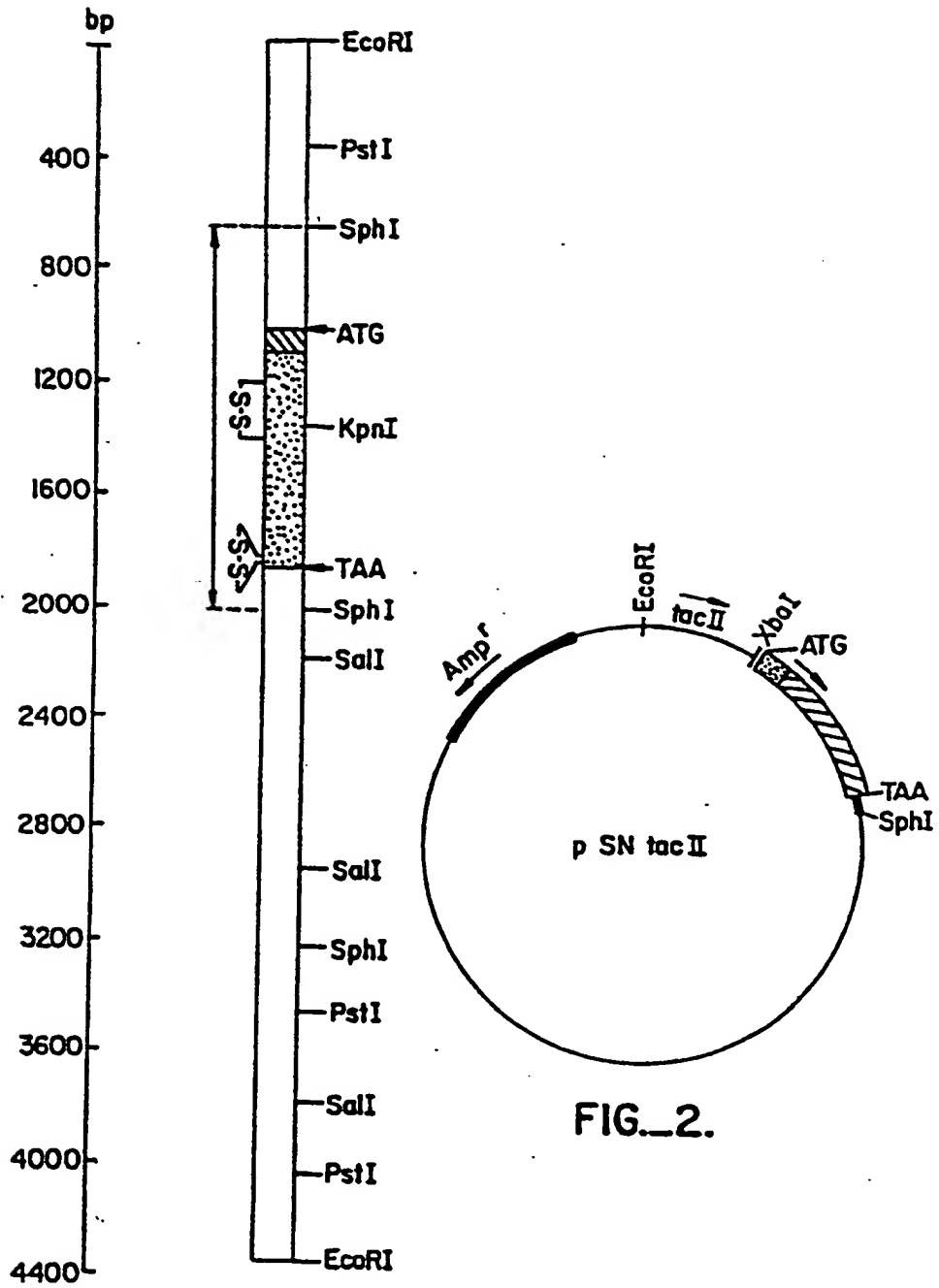


FIG. 1.

FIG. 2.

⑫ 公開特許公報(A) 平2-225599

⑬ Int. Cl.³ 識別記号 庁内整理番号 ⑭ 公開 平成2年(1990)9月7日
 C 11 D 7/42 6779-4H
 7/54 6779-4H
 7/60 6779-4H
 C 12 N 9/20 7823-4B
 15/55 ZNA ※
 審査請求 未請求 請求項の数 26 (全28頁)

⑮ 発明の名称 修飾酵素を用いる酵素的過酸漂白系

⑯ 特 願 平1-324153

⑰ 出 願 平1(1989)12月15日

優先権主張 ⑱ 1988年12月19日 ⑲ 米国(US) ⑳ 286,353

㉑ 発 明 者 エイオーカラン・ジェ アメリカ合衆国カリフォルニア州サン・ブルノ、カーメ
 イ・ポールス ル・ドライブ2540

㉒ 発 明 者 スーザン・エイ・アン アメリカ合衆国カリフォルニア州メンロ・パーク、エディ
 ダーソン ソン・ウェイ3499

㉓ 出 願 人 ザ・クロロックス・カ アメリカ合衆国カリフォルニア州オークランド、ブロード
 ンパニー ウエイ1221

㉔ 代 理 人 弁理士 竹内 澄夫 外2名
 最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

修飾酵素を用いる酵素的過酸漂白系

2. 特許請求の範囲

1. 過酸の現場生成のための酵素的過加水分解系であって、

(a) 加水分解活性をもつ修飾酵素であって、

加水分解活性をもち、シュードモノスビューテ
 イグATCC 33552から単離可能であるが、それと
 は次のどちらかの位置にある少なくとも1個のア
 ミノ酸が異なる酵素に実質上、対応するアミノ
 酸配列をもつ修飾酵素、

(i) 修飾酵素が結晶状である場合に 126番
 目のセリン、176番目のアスパラギン酸または
 206番目のヒスチジンから約15Å以内；または

(ii) 126番目のセリン、176番目のアスパ
 ラギンまたは206番目のヒスチジンのいずれか
 の側の1次構造からは6個のアミノ酸以内；

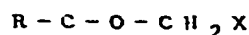
(b) (a)の修飾酵素により加水分解可能な基質、
 および

(c) (a)および(b)と反応し、基質溶解水溶液
 の存在下で過酸を生成する過酸化物質、
 から成る過加水分解系、

2. 基質が次の構造をもつ請求項1の酵素的過
 加水分解系、

O

||



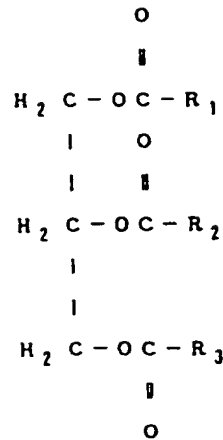
(ここで、Rは少なくとも1個の炭素原子を含む置
 換基で、Xは官能基または炭化水素基である。)

3. Xが、官能基が付加したポリオールまたは
 ポリエーテルである請求項2の酵素的過加水分解系、

4. Xが少なくとも1個の炭素原子と少なくとも1
 個の官能基を含む請求項2の酵素的過加水分解系、

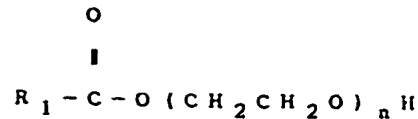
5. (b)の基質を本質的に次の構造からなる基
 質群から選択する請求項4の酵素的過加水分解系、

(i) 次の構造をもつグリセリド、



(ここで、 $\text{R}_1 = \text{C}_1 - \text{C}_{12}$ 、 $\text{R}_2 = \text{C}_1 - \text{C}_{12}$ または H および $\text{R}_3 = \text{C}_1 - \text{C}_{12}$ または H)、

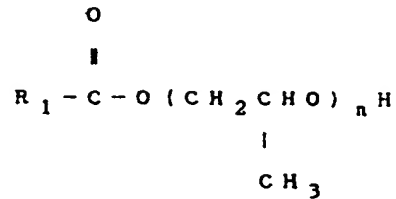
(ii) 次の構造をもつエチレングリコール誘導体、



(ここで、 $n = 1 - 10$ で R_1 は上記の通り定義するもの)、

および

(iii) 次の構造をもつプロピレングリコール誘導体、



(ここで、 R_1 および n は上記の通り定義するもの)

6. 基質が通常は、実質的な化学的過加水分解不能である請求項 5 の酵素的過加水分解系、

7. $\text{R}_1 = \text{C}_6 - \text{C}_{10}$ 、 $\text{R}_2 = \text{C}_6 - \text{C}_{10}$ また

は H および $\text{R}_3 = \text{C}_6 - \text{C}_{10}$ または H である請求項 5 の酵素的過加水分解系、

8. 基質が通常は水に不溶性であり、基質溶解水溶液が乳化剤を含む請求項 1 の酵素的過加水分解系、

9. 乳化剤が水溶性ポリマー；カチオン性、非イオン性、アニオン性もしくは両性イオン性界面活性剤；胆汁酸塩；またはこれらのいずれかの混合物である請求項 8 の酵素的過加水分解系、

10. 炭酸塩、リン酸塩、ケイ酸塩、ホウ酸塩または水酸化物の緩衝剤をさらに含む請求項 8 の酵素的過加水分解系、

11. 基質がトリグリセリドである請求項 1 の酵素的過加水分解系、

12. シュードモノスビューティゲ ICC 53552 から単離可能な酵素が次表のアミノ酸配列をもち、また補助酵素が実質的に同一のアミノ酸配列をもつが、205番目がグルタミン、205番目がアスパラギン、205番目がアスパラギンおよび 207番目がスレオニン、127番目がセリンお

よび 205番目がアスパラギン、127番目がセリンおよび 205番目がスレオニン、127番目がスレオニンおよび 205番目がグルタミン、127番目がアスパラギンおよび 207番目がスレオニン、127番目がスレオニンおよび 205番目がアスパラギンまたは 127番目がアルギニンおよび 207番目がアラニンである請求項 1 の酵素的ペルヒドロ分解系、

1	ala	pro	leu	pro	asp	thr	pro	gly	ala	10	pro	phe	pro
	ala	val	ala	asn	phe	asp	arg	ser	gly	pro	tyr	thr	
	thr	ser	ser	ala	ser	glu	gly	pro	ser	cys	arg	ile	
	tyr	arg	pro	arg	asn	leu	gly	glu	gly	gly	val	arg	65
	his	pro	val	ile	leu	trp	gly	asn	gly	thr	gly	ala	70
	gly	pro	ser	thr	tyr	ala	gly	leu	leu	ser	his	trp	80
	ala	ser	his	gly	phe	val	val	ala	ala	ala	glu	thr	
	ser	asn	ala	gly	thr	gly	arg	glu	met	leu	ala	cys	
	leu	asp	tyr	leu	val	arg	glu	asn	asp	thr	pro	tyr	120
	gly	thr	tyr	ser	gly	lys	leu	asn	thr	gly	arg	val	130
	gly	thr	ser	gly	his	ser	glu	gly	gly	gly	gly	ser	140
	ile	met	ala	gly	glu	asn	thr	arg	val	arg	thr	thr	150
	ala	pro	ile	glu	pro	tyr	thr	leu	gly	leu	gly	ala	

asp	ser	ala	ser	glu	arg	arg	gln	gln	gly	pro	met
170											180
phe	leu	met	ser	gly	gly	gly	asp	thr	ile	ala	phe
pro	tyr	leu	asn	ala	gln	pro	val	tyr	arg	arg	ala
asn	val	pro	val	phe	trp	gly	glu	arg	arg	tyr	val
ser	his	phe	glu	pro	val	gly	ser	gly	gly	ala	tyr
arg	gly	pro	ser	thr	ala	trp	phe	arg	phe	gln	leu
met	asp	asp	gln	asn	ala	arg	ala	thr	phe	tyr	gly
ala	gln	cys	ser	leu	cys	thr	ser	leu	leu	trp	
ser	val	gly	arg	arg	gly	leu					

13. 基質がトリオクタノインまたはトリデカノインである請求項12の酵素的ベルヒドリ分解系。

14. 基質が少なくとも1個のグリセリド部位を含む請求項12の酵素的ベルヒドリ分解系。

15. グリセリド基質を本質的にジグリセリドおよびトリグリセリドからなるグリセリド群から選択する請求項14の酵素的ベルヒドリ分解系。

16. 水溶液と材料とを接触させ、この水溶液に過酸の現場生成のための次の成分を含む酵素的過加水分解系を混合する段階からなる材料漂白方法。

(a) 加水分解活性をもっており、

加水分解活性をもち、シュードモナスビューテ

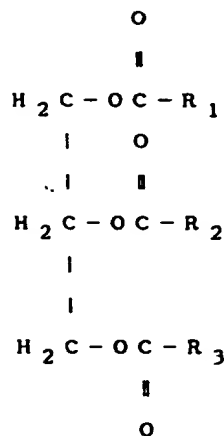
17. 基質(b)が通常は実質的な化学的過加水分解不能である請求項16の方法。

18. Xが、官能基が付加しているポリオールまたはポリエーテルである請求項16の方法。

19. Xが少なくとも1個の炭素原子および少なくとも1個の官能基を含む請求項16の方法。

20. 基質(b)を本質的に次の物質からなる基質群から選択する請求項19の方法：

(i) 次の構造をもつグリセリド



ティグA1CC 53552から単離可能な酵素に実質的に対応するアミノ酸配列をもっているが、次のいずれかの位置にある少なくとも1個のアミノ酸が異なっている修飾酵素、：

(i) 修飾酵素が結晶状である場合、126番目のセリン、176番目のアスパラギン酸または206番目のヒスチジンから約15A以内；

(ii) 126番目のセリン、176番目のアスパラギン酸または206番目のヒスチジンのいずれかの側の1次構造から約6個のアミノ酸以内；

(b) 次の構造をもつ官能基が付加したエステルである基質、

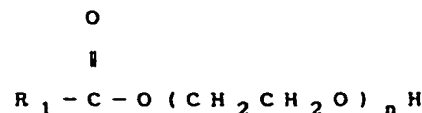


(ここで、Rは少なくとも1個の炭素原子を含む置換基であり、Xは官能基であり、この基質は酵素(a)により加水分解可能である)、および

(c) (a) および(b)と反応し、上記過酸を生成する過酸化物質。

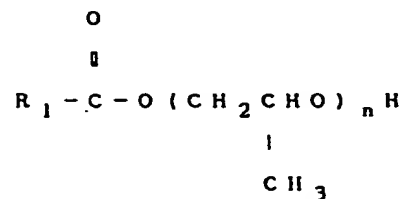
(ここで、 $\text{R}_1 = \text{C}_1 - \text{C}_{12}$ 、 $\text{R}_2 = \text{C}_1 - \text{C}_{12}$ またはHおよび $\text{R}_3 = \text{C}_1 - \text{C}_{12}$ またはH)。

(ii) 次の構造をもつエチレングリコール誘導体



(ここで、 $n = 1 - 10$ でR1は上記の通り定義する)、および

(iii) 次の構造をもつプロピレングリコール誘導体



(ここで、 R_1 および n は上記の通り定義されるもの)

21. $R_2 = C_6 - C_{10}$. $R_2 = C_6 - C_{10}$ または H および $R_3 = C_6 - C_{10}$ または H である請求項20の方法。

22. 基質が通常は水に不溶性であり、過加水分解系にさらに乳化剤が含まれ、シュードモナスビューティグ ATCC 53552 から単離可能な酵素が次表のアミノ酸配列をもち、修飾酵素が実質的に同一のアミノ酸配列をもつが、205番目がグルタミン、205番目がアスパラギン、205番目がアスパラギンおよび207番目がスレオニン、127番目がセリンおよび205番目がアスパラギン、127番目がセリンおよび205番目がスレオニン、127番目がスレオニンおよび205番目がグルタミン、127番目がアスパラギンおよび207番目がスレオニン、127番目がスレオニンおよび205番目がアスパラギンまたは127番目がアルギニンおよび207番目がアラニンである請求項16の方法。

1	ala	pro	leu	pro	asn	thr	pro	gly	ala	10	pro	phe	pro
	ala	val	ala	asn	phe	asn	arg	ser	gly	20	pro	tyr	thr
	thr	ser	ser	gln	ser	glu	gly	pro	ser	30	cys	arg	ile
	tyr	arg	pro	arg	asp	leu	gly	gln	gly	40	gly	val	arg
	his	pro	val	ile	leu	trp	gly	asn	gly	50	thr	gly	ala
	gly	pro	ser	thr	tyr	ala	gly	leu	leu	60	ser	his	trp
	ala	ser	his	gly	phe	val	val	ala	ala	70	ala	glu	thr
	ser	asn	ala	gly	thr	gly	arg	glu	met	80	leu	ala	cys
	leu	asp	tyr	leu	val	arg	glu	asn	asp	90	thr	pro	tyr
	gly	thr	tyr	ser	gly	lys	leu	asp	thr	100	gly	arg	val
	gly	thr	ser	gly	his	ser	gln	gly	gly	110	gly	gly	ser
	ile	met	ala	gly	gln	asp	thr	arg	val	120	arg	thr	thr
	ala	pro	ile	gln	pro	tyr	thr	leu	gly	130	leu	gly	his
	asp	ser	ala	ser	gln	arg	arg	gln	gln	140	gly	pro	met
	phe	leu	met	ser	gly	gly	gly	asp	thr	150	ile	ala	phe
	pro	tyr	leu	asn	ala	gln	pro	val	tyr	160	arg	arg	ala
	asn	val	pro	val	phe	trp	gly	gln	arg	170	arg	tyr	val
	ser	his	phe	glu	pro	val	gly	ser	gly	180	gly	ala	tyr
	arg	gly	pro	ser	thr	ala	trp	phe	arg	190	phe	gln	leu
	met	asp	asp	gln	asp	ala	arg	ala	thr	200	phe	tyr	gly
	ala	gln	cys	ser	leu	cys	thr	ser	leu	210	leu	trp	
	ser	val	gly	arg	arg	gly	leu			220			

23. 乳化剤を本質的に水溶性ポリマー、カチオン性、非イオン性、アニオン性、両性イオン性、胆汁酸塩およびこれらのいずれかの混合物からなる乳化剤群から選択する請求項22の方法。

24. 本質的に炭酸塩、リン酸塩、ケイ酸塩、ホウ酸塩および水酸化物からなる緩衝剤群から選択する緩衝剤をさらに含む請求項16の方法。

25. 基質を本質的にジグリセリドおよびトリグリセリドからなる基質群から選択する請求項16の方法。

26. 乳化剤の非存在下で過加水分解系で達成される過酸収量を少くとも維持し、または改善することが可能な乳化剤をさらに含む請求項16の方法。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は一般に過酸漂白に関連するものであり、特に新規な酵素的過加水分解(perhydrolysis)系および漂白向上のための水溶液における上記分解系の使用法に関連するものである。

に起因する炭水化物によるしみに対して有用であることがみとめられている。酵素リパーゼも前洗浄または前浸漬の段階で脂質によるしみを加水分解するために有用であることがみとめられている。洗浄または界面活性剤における酵素の使用に関連して、ノボ・インダストリーA/S社申請の欧州共同体特許出願、公開番号第 0 130 064号は洗浄用途において界面活性剤とともに使用する酵素添加剤の改善に関係するものである。この発行文献では、60℃以下の比較的低温を含む広汎な洗浄温度において、脂質分解性の洗浄効率を実質的に改善するため、酵素リパーゼの使用が考察されている。この文献では、さらに、脂質によるしみを少くとも部分的に溶解または軟化する手段として、しみや汚れと直接相互作用するためのリパーゼなどの酵素の使用が開示されている。

1976年 8月10日にWeynに対して与えられた米国特許第 3,974,082号ではアルキルエステルを水溶液中で酵素エステラーゼまたはリパーゼと混合し、上記エステルからアシル基が遊離すると主張され

(従来技術)

各種漂白剤が織物の洗浄および前洗浄などの多数の洗浄用途ならびに堅い表面の洗浄のような他の用途に長年、使用されてきている。これらの用途では、漂白剤が織物、繊維および堅い表面の種々のしみや汚れを酸化する。

過酸化水素、過炭酸ナトリウムおよび過ホウ酸ナトリウムのような過酸化物質漂白剤は酸化力があるため乾燥漂白剤処方において有用であることがみとめられている。

過ホウ酸塩漂白剤にテトラアセチルエチレンジアミンのような活性化剤などのある種の有機物質を添加すると、反応場 (in situ) において過酸が生成するため、漂白性能を改善できることもみとめられている。織物、繊維その他の材料用の洗浄成分である種のしみや汚れを除去する各種酵素を含むものも開発されている。例えば、タンパク分解酵素は特に織物の洗浄においてタンパク質によるしみを加水分解するために有用であることがみとめられている。酵素アミラーゼは例えば食品

ている漂白成分およびその使用法が開示されている。Weynの特許では、さらに、この混合物を過酸化物質と併用すると、反応場において過酸が生成すると主張されている。

したがって、高温における性能を維持しながら、低温における洗浄条件において水溶液中の性能を向上させることができる改善された漂白性または活性化酸化剤系の必要性があることがみとめられている。

(発明が解決しようとする課題)

本発明により過酸を生成するための、過酸化水素源の存在下で基質を酵素的に過加水分解し、過酸を生成する活性化酸化剤系が得られる。本発明の新規な酵素は触媒的に作用し、基質の反応性を向上させ、結果的に反応場において過酸を生成させる。これらの酵素はアニオン性界面活性剤が存在しても基質トリグリセリドに対して秀れた過加水分解特性および良好な反応性を示す。したがって、本発明の酵素的過加水分解系はアニオン性界面活性剤を利用している市販の界面活性剤と併用

することが可能である。

本発明の新規な酵素は基準酵素に関連して修飾されている。基準酵素は *Pseudomonas putida* ATCC 53552 から単離可能で、次表のアミノ酸配列をもつ。

1	ala	pro	leu	pro	asp	thr	pro	gly	ala	20	pro	phe	pro
21	ala	val	ala	asn	phe	asp	arg	ser	gly	pro	tyr	thr	
22	thr	ser	ser	gln	ser	gln	gly	pro	ser	cys	arg	lle	
23	tyr	arg	pro	arg	asn	leu	gly	gln	gly	gly	val	arg	
24	his	pro	val	lle	leu	trp	gly	asn	gly	thr	gly	ala	
25	gly	pro	ser	thr	tyr	ala	gly	leu	leu	ser	his	trp	
26	ala	ser	his	gly	phe	val	val	ala	ala	ala	gln	thr	
27	ser	asn	ala	gly	thr	gly	arg	gln	met	leu	ala	cys	
28	leu	asn	tyr	leu	val	arg	gln	asn	asp	thr	pro	tyr	
29	gly	thr	tyr	ser	gly	lys	leu	asn	thr	gly	arg	val	
30	gly	thr	ser	gly	his	ser	gln	gly	gly	gly	gly	ser	
31	lle	met	ala	gly	gln	asp	thr	arg	val	arg	thr	thr	
32	ala	pro	lle	gln	pro	tyr	thr	leu	gly	leu	gly	his	
33	asp	ser	ala	ser	gln	arg	arg	gln	gln	gly	pro	met	
34	phe	leu	met	ser	gly	gly	gly	asp	thr	lle	ala	phe	
35	pro	tyr	leu	asn	ala	gln	pro	val	tyr	arg	arg	ala	

36	asn	val	pro	val	phe	trp	gly	gln	arg	arg	tyr	val	
37	ser	his	phe	gln	pro	val	gly	ser	gly	gly	ala	tyr	
38	arg	gly	pro	ser	thr	ala	trp	phe	arg	phe	gln	leu	
39	met	asp	asn	gln	asn	ala	arg	ala	thr	phe	tyr	gly	
40	ala	gln	cys	ser	leu	cys	thr	ser	leu	leu	trp		
41	ser	val	gly	arg	arg	gly	leu						

本発明の修飾酵素は次のいずれかにある、少く

とも1個のアミノ酸が基準酵素と異なっている：

(1) 126番目のセリン、176番目のアスパラギン酸または206番目のヒスチジンから約15オングストローム以内(基準酵素の3次構造に関連して)；または(2) 126番目のセリン、176番目のアスパラギン酸または206番目のヒスチジンのいずれかの個のアミノ酸6個以内(基準酵素の1次構造に関連して)、活性化酸化剤系の基質を過酸化水素源の存在下において過酸を生成させる、酵素が触媒する反応のために選択する、各種のトリグリセリドは基質を形成するために特に適している。特に望ましい基質はトリオクタノインおよびトリデカノインである。

本発明の酸化剤系には基質と混合し、酵素によ

り活性化されると反応場(in situ)において有機性過酸を生成する過酸化水素源が含まれる。米国における洗濯条件では、このように生成される、特に望ましい有機性過酸はペルオクタン酸である。

本発明の酵素的過加水分解系には、比較的安価な基質を少量の酵素と共に用いて過酸を生成させるなど数多くの利点がある。望ましいトリグリセリド基質では等温度の単純なエステル基質に比較し高濃度の過酸が得られる。本発明の酵素的過加水分解系は低温の洗浄溶液において過酸を生成するのに非常に有効であることが見出されている。(課題を解決するための手段)。

本発明の酵素的過加水分解(perhydrolysis)系は本質的に、上記に明確にした新規な酵素、基質および過酸化水素源からなる。したがって、本発明は過酸または過加水分解の化学を基盤としている。

新規な酵素、基質および過酸化水素源を含む酵素的過加水分解系の本質的な成分の他に、本発明の過加水分解系には水溶液にある場合、基質を

懸濁状態に維持したり、基質を溶解するために、また過酸化水素源からの過酸化水素の存在下での基質と酵素の相互作用を促進するために選択する1種以上の乳化剤も含まれることが望ましい。この種の1種以上の乳化剤を使用することは、乳化剤が酵素とグリセリド基質の相互作用を向上させることのできる液相界面の形成を促進する作用をもつように特に考慮される。過加水分解系には下記により詳細に述べる緩衝剤、安定化剤および他の添加剤も含めることが望ましい。

(発明が解決しようとする課題) および(実施例) および特許請求の範囲を含む本発明を確実に正しく理解し、解釈するために、本明細書で使用される術語の使用法を明確にするために下記に、定義を述べる。定義する術語には次のものが含まれる。

「過加水分解(perhydrolysis)」は選択した基質と過酸化物の反応により過酸と水が生成することと定義する。

過酸を生成する望ましい過加水分解反応では、

過酸化物出発材料と過酸生成物は共に酸化剤である。従来、無機性過酸化物は例えばドライクリーニング漂白剤の酸化剤として使用されている。過酸生成物はその酸化作用によりクリーニング漂白にとって有効な汚れ除去剤となるが、酸化剤としての過酸生成物はクリーニング漂白製品に使用されている染料その他の添加剤とほとんど反応しないほど十分緩和であるので、本発明によれば過酸生成物は通常、クリーニング漂白に望ましい酸化剤である。しかし、酵素的過加水分解系を化学的過加水分解系と併用することは本発明の範囲内である。

「化学的過加水分解」には一般に、活性化剤または過酸前駆体が過酸化水素源と化合する過加水分解反応が含まれる。化学的過加水分解の過酸前駆体の 1 種は本出願と同一出願人による "DIPEROXYACID PRECURSORS AND METHOD" と題する 1988 年 4 月 5 日に与えられた米国特許第 4,735,740 号に開示されている。この明細書では水溶性で、過酸化物質と共に水に溶解する態、反応場 (in situ)

における化学的過加水分解によりペルオキシ酸を生成するジカルボン酸のスルホン化フェニルエステルが述べられている。

「酵素的過加水分解」は一般に加水分解酵素と分類され、下記に具体的に列記される酵素により促進、すなわち触媒される過加水分解反応と定義する。

酵素的過加水分解系の 3 つの本質的な成分の特徴および望ましい実例をまず、下記で考察し、ついで過加水分解系と共に使用する他の添加剤を簡潔に考察し、さらに本発明の酵素的過加水分解系を示す多くの実例を述べる。

基質

上記のように、酵素的過加水分解系の基質は過酸化物質の存在下で過酸を生成するために、酵素により触媒される反応のために選択される。下記にさらに詳細に考察するように、ある種の基質は通常、固体であるので、基質、酵素および過酸化物質を含む乾燥処方剤に使用するのに特に適している。このような製品では乾燥処方剤の有効期間

が長く、処方剤を水溶液に添加するまでは酵素により触媒される反応が起きないことが重要である。

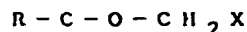
例えば、クリーニング用界面活性剤に使用する場合には基質が界面活性特性を示すことがあり、そのため、洗浄する織物の表面または表面付近で過酸の現場生成が起きる。このことは漂白作用の原因となる酸化剤の有効性が高まることを保証される。

酵素的過加水分解系の基質は本発明の新規な酵素はエステラーゼ活性をもっているので各種のエステル (RCOOR') から選択することができ、また本発明の新規な酵素はリパーゼ活性をもっているので脂質から選択することもでき、また、これら双方から選択することができる (例えば脂肪酸エステル脂質)。本発明によれば、各種の脂肪酸またはグリセリド型材料が本発明の酵素的過加水分解系の基質を形成するのに特に適していることが見出されている。

本発明の基質は次の構造をもつ官能基の付加したエステルであることが望ましい。

O

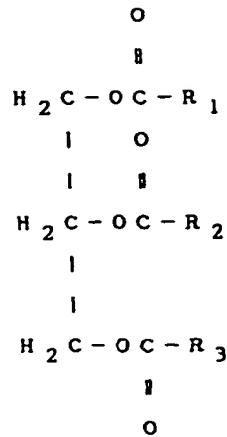
||



ここで、R は少なくとも 1 個の炭素原子をもつ置換基であり、また R はフェノール基、ハロゲン基またはハロゲン原子のような 1 種以上の官能基またはヘテロ原子で随意に置換されている置換または分子アルキルであることがさらに望ましく、また X は官能基である。基質は上記に明らかにしたように酵素的加水分解が可能であり、通常、実質的な化学的過加水分解は受けないことが望ましい。上記官能基は官能基の付加したポリオールまたはポリエーテルからなることがさらに望ましい。さらに広くいえば、官能基は少なくとも 1 個の炭素原子および少なくとも 1 個の官能基である。

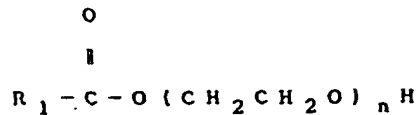
本発明の基質は本質的に次の基質群から選択することがなお一層望ましい。

(i) 次の構造をもつグリセリド



ここで、 $\text{R}_1 = \text{C}_1 - \text{C}_{12}$ 、 $\text{R}_2 = \text{C}_1 - \text{C}_{12}$ またはHおよび $\text{R}_3 = \text{C}_1 - \text{C}_{12}$ またはH；

(ii) 次の構造をもつエチレングリコール誘導体すなわちエトキシル化エステル



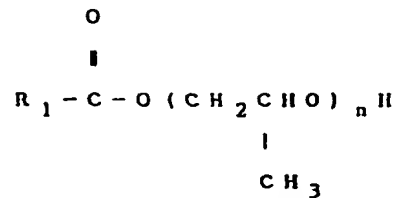
ている。

グリセリドは酸または塩基と共に沸騰させる場合またはリパーゼの作用により加水分解を受ける。グリセリド（すなわち、アシルグリセロール）、特にジグリセリド（ジアシルグリセロール）およびトリグリセリド（トリアシルグリセロール）は本発明の酵素的過加水分解系で特に望ましい。これは各トリグリセリド分子は最高3種の脂肪酸いいかえると過酸分子を当量ずつ生じさせることができるからである。したがって、下記にさらに詳細に考察するように、過酸化剤および酵素の存在下で最大の酸化力を得るのに、上記のようなグリセリドを使用することが特に有効であろう。

概して、グリセリド基質は約1個から約18個の炭素原子を含む脂肪酸をもつことを特徴とする。酢酸のような製品に由来する低分子量のグリセリドは天然には液体である。したがって、洗剤のようなドライ処方にもこのような基質を含めるためには追加的の工程段階が必要であろう。しかし、低分子量グリセリド製品は高温の洗浄用途においてよ

（ここで、 $n = 1 - 10$ で R_1 は上記の通り定義する）、および

(iii) 次の構造をもつプロピレングリコール誘導体



（ここで、 R_1 および n は上記の通り定義する。）

上記に言及した望ましい構造で R_1 は $\text{C}_6 - \text{C}_{10}$ であることがさらに望ましく、 $\text{C}_7 - \text{C}_9$ であることが最も望ましく、また R_2 は $\text{C}_6 - \text{C}_{10}$ またはHであることがさらに望ましく、 $\text{C}_7 - \text{C}_9$ またはHであることが最も望ましく、また R_3 は $\text{C}_6 - \text{C}_{10}$ またはHであることがさらに望ましく、 $\text{C}_7 - \text{C}_9$ またはHであることが最も望ましい。上記の構造(i)において R_1 、 R_2 および R_3 は鎖長が異なることが可能であり、このような異なるグリセリドの混合物が本発明に適して

り有効である傾向をもつ。

鎖長が炭素原子数17個であることを特徴とするステアリン酸のような高分子量グリセリド基質は通常、固体であり、したがって、例えばドライ洗剤処方にもめるのは容易であろう。しかし、このような高分子量脂肪酸鎖は本発明によれば酸化力が最大にならない場合がある。本発明の酵素的過加水分解系に使用する最も望ましい基質は炭素数がそれぞれ8個および10の（カルボニル炭素を含む）脂肪酸をもつことを特徴とするトリオクタノインまたはトリデカノインのいずれかであることが見出されている。

これら2種のトリグリセリドも固体である傾向があり、したがって、上記に考察したドライ処方に含めるのに適している。同時に、トリオクタノインおよびトリデカノインは水溶液で界面活性剤的特性を示す傾向があり、したがって、上記に考察したように反応場（in situ）における過酸の処方に適している。最も望ましいトリオクタノインおよびトリデカノインのようなトリグリセリド

を含む、上記に考察した基質のすべては比較的安価であり、本発明の酵素的過加水分解系の初期コストを低下させるのに重要である。下記でも考察するように、水溶液で考慮される反応場 (in situ) における過酸の生成を行うのに必要な酵素量は化学量論的な量より少なく、非常に少量でよいという点で、基質および過酸化水素源は酵素的過加水分解系の2つの主要な成分である。このように酵素は反応に関与しても、消費されずに次の反応のために再生するという点で触媒様式で作用する。

過酸化物源

ほとんどすべての過酸化物源が本発明の酵素的過加水分解系の酸化剤源として十分である。例えば、過酸化物源は過ホウ素酸ナトリウムや過炭酸ナトリウムのような過ホウ素酸塩や過炭酸塩から構成することができる。さらに過酸化物源は尿素過酸化水素などから構成され、これらの付加物を含む場合がある。

望ましい過酸化物源として過ホウ素酸ナトリウム一水和物、過ホウ素酸ナトリウム四水和物、炭

酸ナトリウムペルオキシ水和物、ピロリン酸ナトリウムペルオキシ水和物、尿素ペルオキシ水和物、過酸化ナトリウムおよびこれらの混合物がある。過ホウ素酸ナトリウム一水和物および過ホウ素酸ナトリウム四水和物は特にアルカリ性の過酸化物源として特に望ましい。過酸化物源（すなわち、水溶液中で過酸化水素を生成する化合物）はそれ自体、過酸化物性漂白物質である。しかし、酵素的過加水分解系では漂白性が改善される。したがって、酸化剤源を過酸化水素を生成するために上記の考察にしたがって選択することを除けば特定の酸化剤源についてさらに考察することは必要ないと考えられる。

酵素

本発明の修飾酵素は過酸化物および望ましい過酸が存在するため、酵素的過加水分解系を使用する間、酵素にとって有害な酸化的環境にある。過酸化物または過酸のいずれかが使用中の酵素を不活性化することがあろう。したがって、本発明に適する酵素は予測される範囲の過酸化水素および

望ましい範囲の過酸の存在下で十分に過加水分解活性を示さなければならない。

本発明の修飾酵素は基準酵素に関連して修飾されている。この基準酵素は1986年11月19日に出版された米国特許出願第 932,717号に述べられている。基準酵素（時に「リパーゼ 1」と呼ぶ）はシユードモナスビユーティゲ（以下、*Pseudomonas putida*又は*P. putida*ともかく）株から分離され、単離できる。*Pseudomonas* は短い棒の形をした細菌属である。*P. putida*を含むいくつかの細菌株は炭素源をモノオレイン酸ポリオキシエチレン（"Iwreen 80", Alfa Chemical社販売）とする最少培地でわずかに増殖する。Howe等による *J. Gen. Microbiol.*, 92(1), pp. 234-235(1976) を参照。リパーゼ 1酵素を単離する新細菌 *Pseudomonas putida* 株の培養試料はHPEP 608.1(P) にしたがって、American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852 の永久培養コレクションに保管されており、ATCC 53552と呼ばれている。

基準酵素を時に「リパーゼ 1」と呼ぶが、修飾酵素および基準酵素はリパーゼあるいはクチナーゼと考えることができることを理解する必要がある。これは基準酵素のアミノ酸配列の分析により、本酵素のヌクレオチド配列と、最近、*C. capsici* について決定されたクチナーゼ遺伝子のヌクレオチド配列との間にはかなりの相同性があることが示唆されているからである。したがって、本発明の修飾酵素および基準酵素を以後、グリセロールエステル加水分解酵素、あるいは早に加水分解活性をもつ酵素と呼ぶことができる。

本発明の修飾酵素は上記に述べた *Pseudomonas putida* 株の天然株あるいは人為的な変異株から得ることができる。さらに、本発明の菌株を他の細胞の対応する遺伝子に形質転換するような、リパーゼ生成に適用できる遺伝子工学的手法も適用できる。これらの手法により生成させ、単離した、加水分解活性をもつ修飾酵素を本発明に含める。したがって、例えば基準酵素または修飾酵素を望ましい酵素の遺伝子を含む *E. coli* を通常の培地で

培養して生成させ、酵素を単離・生成することができる。液体培養あるいは固体培養を適用することができる。水中曝気培養は工業的生産に適している。通常の普通培地を使用することができる。

培養温度は細菌の好適増殖温度により変化させることができるが、25-35℃であることが望ましい。培養時間は便宜選択できるが、15-50時間である。培養は加水分解活性をもつ酵素の培地中濃度が最大になった時に終了させる。

好適な酵素は発酵ブイオン中に蓄積し、ブイオンからの粗製酵素の抽出は次のように行うことができる：

細胞および細胞片をまずマイクロフィルターによる口過および遠心により細胞ブイオン培養試料全体から除去し、ついで限外ろ過によりリパーゼを濃縮する。次に過剰の塩および着色物質は透析またはダイアフィルトレーションにより除去する。さらに、粗酵素溶液をタンパク質の通常の精製法により精製することができる。凍結乾燥により酵素粉末を得ることができ、これを本発明の成分に

ser	his	phe	gln	pro	val	gly	ser	gly	gly	ala	tyr
arg	gly	pro	ser	thr	ala	lys	phe	arg	phe	gln	leu
met	asp	asn	gln	asp	ala	arg	ala	thr	phe	tyr	gly
ala	gln	cys	ser	leu	cys	thr	ser	leu	leu	lys	
ser	val	gly	arg	arg	gly	leu					

*Pseudomonas putida*の突然変異株または変異株は後に示すように環境選択圧力法、UV照射、あるいは変異原性物質の使用により得ることができる。

また、遺伝子工学的手法、例えばプラスミドDNAを複製能力のある宿主に伝達するか、またはリパーゼ生成細菌細胞からリパーゼの染色体遺伝子コードを切除し、この遺伝子を適当なベクター分子にクローニングさせる方法によっても生成させることができる。本発明の修飾酵素は本酵素を生成する作用を保持し、変動し、または向上している突然変異株、変異株またはクローン化株により得られる。

第1図はpSNE4の4.3kb [cOR1] フラグメントのマップである。斜線部はシグナルペプチドコドン(コドン-22から+1)を示し、斑点領域は成熟

使用することができる。

リパーゼ1、すなわち基準酵素は次の表に示すアミノ酸配列をもつ。

1	ala	pro	leu	pro	asp	thr	pro	gly	ala	19	pro	phe	pro
20	ala	val	ala	asn	phe	asp	arg	ser	gly	pro	tyr	thr	
30	thr	ser	ser	gln	ser	gln	gly	pro	ser	cys	arg	ile	
40	tyr	arg	pro	arg	asp	leu	gly	ala	gly	gly	val	arg	
50	his	pro	val	ile	leu	lys	gly	asn	gly	thr	gly	ala	
60	gly	pro	ser	thr	tyr	ala	gly	leu	leu	ser	his	trp	
70	ala	ser	his	gly	phe	val	val	ala	ala	ala	gln	thr	
80	ser	asn	ala	gly	thr	gly	arg	gln	met	leu	ala	cys	
90	leu	asp	tyr	leu	val	arg	gln	asn	asp	thr	pro	tyr	
100	gly	thr	tyr	ser	gly	lys	leu	asn	thr	gly	arg	val	
110	gly	thr	ser	gly	his	ser	gln	gly	gly	gly	gly	ser	
120	ile	met	ala	gly	gln	asp	thr	arg	val	arg	thr	thr	
130	ala	pro	ile	gln	pro	tyr	thr	leu	gly	leu	gly	his	
140	asp	ser	ala	ser	gln	arg	arg	gln	gln	gly	pro	met	
150	phe	leu	met	ser	gly	gly	gly	asp	thr	ile	ala	phe	
160	pro	tyr	leu	asn	ala	gln	pro	val	tyr	arg	arg	ala	
170	asn	val	pro	val	phe	trp	gly	gln	arg	arg	tyr	val	

リパーゼ1ポリペプチドのコドン+1から+258に対するコード領域を示す。仮定されているジスルフィド結合も示した。目盛は塩基対(bp)で表してある。配列が決定されている領域(1363bpのSphIフラグメント)を二重矢印をつけて示してある。

ATG 開始コドンおよびTAA 停止コドンにも印をつけてある。

基準酵素の生成を行う適当な手段はクローニング法であり、実施例9の方法にしたがえば驚くほどの高収量が得られているので、実施例9で示すリパーゼ1のクローニングおよび表現を以下において述べる。

リパーゼ1は秀れた加水分解活性をもち、環境が酵素にとって有害で酸化性であっても過酸化物質の存在下で基質から過酸を生成する。リパーゼ1は通常は酵素の活性を阻害するアニオン性界面活性剤の存在下でも過酸を生成する。さらにリパーゼ1ではリパーゼCESのような市販の酵素に比較し、過酸/酸の比率(すなわち、すでに考察している酸/過酸の比率の逆数)が高い。リパーゼ

1は*P. putida*の発酵作用から粗製製品として得られ、使用することでもできるが、イオン交換やゲル透過クロマトグラフィーのような従来の手段により他のタンパク質と分離・精製し、酵素的に実質的に純粋なリパーゼ 1を得ることが望ましい。これは主に、*P. putida*の粗製発酵ブイオンにリパーゼ 1の他に別の酵素（以下、「リパーゼ 2」と呼ぶ）が含まれているからである。

2種の酵素、リパーゼ 1とリパーゼ 2はクロマトグラフィーのような従来技術により分離することができる。これらの酵素はp-ニトロフェニル酢酸塩およびp-ニトロフェニルカブリン酸に対する加水分解速度が異なることにより識別することができる。リパーゼ 1は後に、さらに特定的に述べるとように*E. coli*のような宿主細菌によりクローン化し、本酵素を表現(express)させ、ついでクローン化リパーゼ 1のオクタルセファロースクロマトグラフィーによっても精製することができる。

リパーゼ 2もグリセリド基質を加水分解するの

で使用する事ができる。

本発明にとって望ましい修飾酵素は基準酵素に比較し、過酸生成の効率が匹敵するか、改善されている。酸/過酸の比率（ミリ当量/ミリ当量）は過酸を生成する酵素の効率の指標である。比率が低いほど、通常は過酸の生成量がより望ましく多いことを意味する。比率が 1に等しい酵素では約14分以内に基質から過酸への変換が最大（約50%）となる。実施例でさらに十分に示すように、リパーゼ 1で実験的に検査すると酸/過酸の比率は約 4-5である。本発明によれば酸/過酸の比率が約 1から約 4-5の望ましい修飾酵素が調製されている。特に望ましい修飾酵素で検査すると酸/過酸の比率は 1-3である。

このような特に望ましい修飾酵素では 1個または 2個のアミノ酸が酵素リパーゼ 1と異なる。ある特に望ましい実施例では 127番目が（グルタミンではなく）セリン、また 205番目が（スレオニンではなく）アスパラギンである。この特に望ましい実施例（"Ser-127/Asn-205"ということも

ある）で良好な酸/過酸の比率が維持される。別の特に望ましい修飾酵素では 205番目がアスパラギン、207番目がスレオニンである。この修飾酵素では特異的活性および酸/過酸の比率が良好である。さらに別の特に望ましい酵素では 205番目がアスパラギンである。この修飾酵素では酵素濃度が低い場合、酸/過酸の比率が良好である。さらに別の特に望ましい修飾酵素では 205番目がグルタミンである。この修飾酵素では酵素濃度がより低いとか等しくてもリパーゼ 1型酵素と過酸の収量が実質的に等しい。酸/過酸の比率が秀れているさらに別の特に望ましい修飾酵素は次の通りである：Ser-127/Thr-205、Thr-127/Gln-205、Asn-127/Thr-207、Thr-127/Asn-205、およびArg-127/Ala-207。

後で分るように、これらのアミノ酸修飾はすべて通常の 126番目のセリン、176番目のアスパラギン酸または 206番目のヒスチジンから基準酵素の 3次構造に関連して約15オングストローム以内である。15オングストローム以内の位置の修飾部

位を決定するのにその結晶構造を利用できない場合に、基準酵素のアミノ酸を変更できる位置を記述する別の方法は基準酵素の 1次構造に関連して 126番目のセリン、176番目のアスパラギン酸または 206番目のヒスチジンのいずれかの側のアミノ酸 6個以内に少なくとも 1個のアミノ酸の変更がみとめられるとする方法である。

本発明の基準酵素および修飾酵素のこれら 3つのアミノ酸の位置（126、176および 206番目）はアミドおよびエステルの加水分解に直接関与していると考えられるので、時に「触媒性 3残基」ということもある。実際には、この触媒性 3残基は「触媒性 4残基」といえよう。これは結晶構造の解析により 214番目のセリンが 102番目のアスパラギン酸から水素結合できる距離内にあることが示されているからである。その結果、本発明の修飾酵素は 214番目のいずれかの側の「修飾領域」以内で基準酵素とさらに異なっていると考えられる。

後に分るように、基準酵素、すなわちリパーゼ

1に実質的に対応する加水分解活性とアミノ酸配列をもつ修飾酵素をリバーゼ 1について記述した方法と類似した方法で得て、使用することができる。したがって、基準酵素の調製、精製、およびその性質を示す実験データをまず述べ、ついで本発明による修飾酵素の調製を説明する。

乳化剤

乳化剤または界面活性剤を使用することは他の過酸系漂白製品と同様に一般的に望ましい。乳化剤を使用することは酵素とグリセリド基質の相互作用を促進する相の界面を確立し、維持するのに特に有用であると考えられる。同様に乳化剤または界面活性剤は水和内部に酵素と基質を維持するのに有用である。

アニオン性界面活性剤（一般に市販の洗剤にも含まれている）を使用することができる。このようなアニオン性界面活性剤の実例にはC6-C18の脂肪酸および脂肪酸、直鎖および分枝アルキルベンゼンスルホン酸、アルキル硫酸、アルキルエーテル硫酸、アルカンスルホン酸、オレフィンスルホ

ン酸、ヒドロキシアリカンスルホン酸、アシルサルコシンおよびアシルN-メチルタウリンのアンモニウム、置換アンモニウム（例えばモノ、ジおよびトリエタノールアミン）、アルカリ金属およびアルカリ土類金属塩である。

非イオン性界面活性剤も本発明の酵素的過加水分解系に使用するのに適している。非イオン性界面活性剤としては商標名NEODOLでShell Chemical社が販売しているような直鎖エトキシル化アルコールがある。他の非イオン性界面活性剤として平均鎖長が炭素原子数で約6個から16個で、アルコール1モル当たりのエチレンオキシド含量が平均約2から20モルの各種直鎖エトキシル化アルコール；平均鎖長が炭素原子数で約6個から16個で、アルコール1モル当たりのエチレンオキシド含量が平均約0から10モル、プロピレンオキシド含量が平均約1から10モルの直鎖および分枝、1次および2次エトキシル化、プロポキシル化アルコール；平均鎖長が炭素原子数で8から16個で、アルコール1モル当たりのエチレンオキシド含量が平

均1.5から30モルの直鎖および分枝アルキルフェノキシ（ポリエトキシ）アルコール、別名エトキシル化アルキルフェノール；およびこれらの混合物がある。

さらに、非イオン性界面活性剤としてプロピレンオキシドおよびエチレンオキシドのある種のブロックコポリマー、プロポキシル化エチレンジアミン基をもつプロピレンオキシドおよびエチレンオキシドのブロックコポリマーおよびアミノオキシド、ホスフィンオキシド、スルホキシドおよびこれらのエトキシル化誘導体のような半極性非イオン性界面活性剤がある。

本発明に適切なカチオン性界面活性剤には、通常、置換基に結合する官能基の1つがC8-C18のアルキル基で、他の3つの官能基がフェノール基のような不活性の置換基をもつ短鎖アルキル基である第4級アンモニウム化合物がある。

さらに、本発明に適切な両性イオン性界面活性剤（アニオン性水可溶性官能基、カチオン性官能基および疎水性有機性官能基を含む）として、ア

ミノカルボン酸および塩、アミノジカルボン酸および塩、アルキルベタイン、アルキルアミノプロピルベタイン、スルホベタイン、アルキルイミダゾリウム誘導体、ある種の第4級アンモニウム化合物およびある種の第3級スルホニウム化合物がある。潜在的に本発明に適切な両性イオン性界面活性剤の他の実例が本明細書に文献として取り上げてあるJonesの米国特許第4,005,029号にみとめられる。

他の乳化剤の例にポリビニルアルコール（PVA）、ポリビニルピロリドン（PVP）、メチルヒドロキシアロビルセルロース（MHPC）のような水可溶性または分散性ポリマーなど、ならびに胆汁その他の天然の乳化剤がある。

他の添加剤

考慮する特定の用途に応じて各種の補足的添加剤を本発明の酵素的過加水分解系と併用することが考えられる。例えば、本発明の酵素的過加水分解系は直接漂白製品、前洗浄製品（液体であることが多い）および堅い表面に対する各種洗剤のよ

うな広汎な種類の洗剤応用製品または処方に使用したり加えられることが考えられる。

液体処方の場合には、過酸化水素を基質、酵素のいずれかと、できれば双方と分離しておくことが便利であろう。これは1986年4月29日にBeachamらに与えられ、Clorox社を同一出願人とする米国特許第4,585,150号に開示されているような複数チャンバー式ディスペンサーを用いて行うことができる。

本発明に適切な添加剤には香料、染料、ビルダー、安定化剤、緩衝剤などがある。安定化剤は多くの目的を達成するために加えられる。例えば、安定化剤は最初の処方成分としての酵素あるいは処方を水溶液に加えた後にみとめられる中間生成物でも、その有効性を確立し、維持するように作用する。酵素は重金属、有機化合物などのために基質の加水分解を阻害されることがあるので、例えば先行技術で一般に知られている適切な安定化剤を用いて、そのような影響に抵抗させ、処方中の酵素の有効性を最大にすることができよう。

面した。フラスコそれぞれに普通寒天で増殖させ、250rpm, 37℃の条件のNewbrunswick振盪装置上に12時間置いた *P. putida* ATCC 53552 の一夜培養試料を白金耳で播種した。ついで、12時間インキュベートした培養試料を1リットルの発酵装置（使用容積 250ml）、15リットルのBiolaftite発酵装置（使用容積12リットル）または温度調節装置、RPH、空気流および圧力の調節装置を装備した100リットルのBiolaftite発酵装置に所定用量（1-10 μ g/v）播種した。発酵装置の培地には0.6% 普通ブイヨン（Difco）、0.3% リンゴクタン質および0.2% 酵母エキス（Difco）を加えた。最初のpHは6.5であった。播種前に、培地のpHを6.8に調整し、40分間減面した。細菌の増殖および酵素の生成を発酵装置で12-15時間継続させた。

(B) ミクロフィルターろ過による酵素の回収

粗製の発酵培養試料をまず2枚のRoanicon ミリポアフィルター膜（0.22 μ ）をつけたAmicon装置でろ過し、細胞を除去した。クタン粒子に結合した貯留物中の酵素を遠心により集めた。全回収

酵素的過加水分解系を溶解する水溶液の望ましいpHは約8-11であり、約9-10であることがさらに望ましい。水溶液のpHを望ましいアルカリ領域に維持するため、本発明で緩衝剤を使用することができる。緩衝剤には一般に洗剤技術の当業者によく知られているようなすべての材料が含まれる。特に、本発明に使用するのに考慮される緩衝剤には炭酸塩、リン酸塩、ケイ酸塩、ホウ酸塩および水酸化物が含まれるが、これらの緩衝剤に限定はされない。

次の実験法、材料および結果を本発明を示す目的に関し述べる。しかし、本発明の範囲の他の視点、利点、改良点は本発明が関係する技術の当業者には明らかであろう。

（実施例および発明の効果）

実施例 1

(A) 播種 (seeding) および発酵

播種用培地は0.6% 普通ブイヨン（Difco）および1% グルコース（pH6.5）で調製した。この培地100mlを500mlのフェルンバッハフラスコ中で減

率は90%に近かった。

(C) 全細胞ろ液の濃縮および透析

Amicon装置により回収したろ液を2枚のRoanicon Pm 10 モジュールをつけたAmicon限外ろ過装置で3リットルに濃縮した。次に濃縮物を0.01Mリン酸バッファー20リットル、pH7.5で透析し、塩および着色物を除去した。この段階における回収率は平均して約80%であった。この粗製調製物の全活性は 8.68×10^6 であった。リパーゼ活性の単位は0.1% Triton X-100を含む0.1M Tris-HClバッファー、pH8.0中で2.0mM p-ニトロフェニル酪酸と25℃でインキュベートする場合に415nmにおける吸光度が1分当たり1.0増加する酵素量と定義する。

実施例 2

限外ろ過およびダイアフィルトレーション後のリパーゼ活性

実施例1(C)の粗製調製試料について3種のp-ニトロフェニル基質の結合および回収率を検討した。反応条件は0.1% Triton X-100を含む0.1M

TrisでpH 8.0、温度25℃であった。基質はp-ニトロフェニルカブリン酸、p-ニトロフェニルラウリン酸およびp-ニトロフェニルバルミチン酸で、そのデータを表 1に示した。

表 1

基質	K_m (μM)	V_{max} ($\mu mol/分/mg$ タンパク質)
PNPC	214	802
PNPL	167	214
PNPP	183	112

実施例 1(C)調製試料をさらに下記に述べる各種実験に用いた。これらの実験では本発明の酵素的過加水分解系の利用が示されている。しかし、実施例 1(C)調製試料には「リパーゼ 1」および「リパーゼ 2」と呼ばれる 2種の酵素が含まれている。リパーゼ 1はより秀れたベルヒドロラーゼであり、本発明の特に望ましい実施例では酵素的に実質的に純粋なリパーゼ調製試料を用いている。実施例 1(C)の粗製調製試料の分離・精製は実施例 3で述べ、リパーゼ 1とリパーゼ 2の完全分離は実施

より同定された。

実施例 4

親水性クロマトグラフィによるリパーゼ 1とリパーゼ 2の完全分離

リパーゼ 1は疎水性樹脂によるクロマトグラフィでリパーゼ 2と完全に分離できる。限界ろ過およびダイアフィルター後の実施例 1(C)の酵素溶液を 0.5M NaClに調整し、0.5M NaClを含む10mM Tris(Cl)、pH8 で平衡化した 0.8x7cmオクタセファロールカラムに充填し、洗浄して未結合タンパク質を除去した。次の洗浄液を用いた：10mM Tris(Cl)、pH8、2M尿素；10mMリン酸ナトリウム、pH8；10mMリン酸塩、pH8、0.5M NaCl。洗浄後、カラムを50% n-プロパノールになるまで直線的濃度勾配法で展開した。リパーゼ活性の位置を決定するために、カラム画分についてp-ニトロフェニル酪酸 (PNB)およびp-ニトロフェニルカブリン酸 (PNC)に対する活性を測定した。2種のリパーゼが明らかに分離された。すなわち、画分32のPNB/PNCの比率は 4.6であり、画分51のPNB/PNCの比

例 4で述べ（酵素的に実質的に純粋なリパーゼ 1を得ることが望ましい）および極めて純粋なリパーゼ調製試料（すなわち、アミノ酸配列分析用として純粋）を実施例 5に述べる。

実施例 3

イオン交換およびゲル透過クロマトグラフィによるリパーゼ 1およびリパーゼ 2の部分精製

リパーゼ 1はDEAEセファクリルクロマトグラフィおよびセファデックス G-100 により *Pseudomonas putida* 発酵ブイオンから最初、部分精製した。DEAEカラムは10mMリン酸ナトリウムバッファー、pH8で平衡化し、粗製タンパク質を同一バッファーを用いてカラムに充填した。カラムに結合しないPNB(p-ニトロフェニル酪酸)加水分解酵素活性はリパーゼ 1に関連していた。DEAE段階でこのようにして得られたリパーゼ 1は10mMリン酸ナトリウムバッファー、pH8を用いたセファデックス G-100でクロマトグラフィにかけられた。リパーゼ 1はこのカラムから明確なピークとして溶出され、PNB加水分解酵素活性ならびに過加水分解活性に

率は 1.40 であった。これら 2種のリパーゼをそれぞれリパーゼ 1およびリパーゼ 2と呼んでいる。

このカラムの画分をSDS ゲル電気泳動法によりさらに分析した。この分析により、2種のリパーゼ活性は菌株細胞リパーゼに特徴的な分子量 30,000のバンド (band)に付随していた。さらに、リパーゼ 2は二重バンドで移動し、リパーゼ 1の単一バンドと明らかに分離された。アミノ酸配列分析の前に、これら 2種の部分精製酵素を逆相クロマトグラフィにより高分子量および低分子量の混入物質と分離した。

実施例 5

酵素ペプチドフラグメント化試薬のためのHPLCによるリパーゼ 1の精製

アミノ酸配列分析の前に、実施例 3の部分精製酵素を 4.8x100mmのSynChrom Pak C4逆相HPLCカラムを用いるクロマトグラフィによりさらに精製した。このカラム系は 0.05%トリエチルアミン (TEA)および 0.05%トリフルオロ酢酸 (TFA) (溶媒A)を用い 0.5ml/分の速度で平衡化した。100 μ g

から1mgのリパーゼ1をカラムに注入し、タンパク質を溶媒Aおよび0.05%TEAおよび0.05%TFAを含むn-プロパノール(溶媒B)の複合勾配で0.5ml/分の速度で溶出した。通常の勾配はBが0から20%まで5%ずつ増加させ、ついで、Bが60%になるまで1分当りBを5%ずつ増加させた。すべてのリパーゼはこのHPLC溶媒系により不活性化される。溶媒Bが約35%(リパーゼ1)および溶媒Bが約39%(リパーゼ2)で溶出するタンパク質のピークを集め、以後のアミノ酸配列分析およびCNBrフラグメントの調製に用いた。

実施例 6

アミノ酸分析のための臭化シアンペプチドフラグメントの調製および精製

アミノ酸配列分析のための臭化シアンペプチドフラグメントを次のように調製・精製した。実施例5でアールしたリパーゼ1の一部をSpeedVac濃心器で乾燥させてから、8M尿素、88%ギ酸を用いて10mg/mlになるように再懸濁した。この溶液を1容量のギ酸中200mg/mlのCNBrと混合し、2時間、

ラムによるリパーゼ1およびリパーゼ2の精製画分のそれぞれを3容量の溶媒A(0.05%トリエチルアミンおよび0.05%トリフルオロ酢酸)で希釈し、(実施例5のように)クロマトグラフィにかけた。実施例4で述べたように、精製タンパク質をSDSゲル電気泳動法により分析し、ついで、リパーゼ1とリパーゼ2のCNBrフラグメントおよびN末端アミノ酸配列の比較のために個別にアールした。

実施例 8

リパーゼ1の比活性

リパーゼ1の比活性を実施例4のように精製した酵素を用いて測定した。酵素的に実質的に純粋なリパーゼ1の比活性は実施例1(C)の定義にしたがえば3750単位/mgタンパク質である。

実施例 9

[E.Coliにおけるクローン化リパーゼの調製 Pseudomonas Pulidaのリパーゼ1遺伝子のクローニング]

*Pseudomonas pulida*株(ATCC 53552)を200mlのLB(Luriaブイヨン)培地で37℃で一晩増殖させ

室温、暗所でインキュベートした。生成物を逆相分析の前に0.8x7cm 18f-TrisAcryl GF05(coarse)カラムを用い、溶媒A 40%、溶媒B 50%(上記参照)で脱塩した。ペプチドを逆相によるリパーゼ1の精製について上記に示したのと同じ方式を用いて、最初分離した。しかし、溶媒Bは(TEAおよびTFAを含む)35%プロパノールおよび65%アセトニトリルに変更した。最初の分解物およびクロマトグラフィ後のそのピークはSDS/尿素/ピリジンゲルおよび銀染色(silver staining)でも分析した。

クロマトグラムから2つのピークを選択し、今度は0.48x25cmのSynChroPak C4カラムで、上記に述べた条件でこれを再クロマトグラフィにかけた。再クロマトグラフィ後、精製ペプチドをアミノ酸配列分析のために保存した。

実施例 7

リパーゼ1とリパーゼ2の識別:リパーゼ1およびリパーゼ2の臭化シアンフラグメントの調製

(実施例4における)オクチルセファロースカ

た。細胞を遠心により集め、高分子量の全DNAをNucleic Acids Res.7, pp.1513-1523(1979)でBirnboimに記述されている標準法に正確にしたがい調製した。DNAを[CoRI]で完全に消化し、[CoRI]で消化したプラスミドpBR322(ATCC 37017)製品に結合させ、細菌性アルカリホスファターゼで脱リン酸した。DNAの取扱いに使用したすべての酵素は製造元の使用説明書(New England BiolabsまたはBethesda Research Laboratories)にしたがい使用した。結合させたDNAをE.Coli 294(ATCC 31445)の形質転換に用い、アンピリシン抵抗性(Amp^r)コロニーを選択した。その結果、約2x10⁴個の形質転換細胞が得られた(約5x10³/プレート)。プレートに多量の4-メチルウンベリフェリル硫酸溶液(50mM Tris-HCl, pH8.0 中10mM)を注ぎ、紫外線ランプ(波長340nm)で照射した。基質を加水分解し、蛍光性の強い化合物4-メチルウンベリフェロンを遊離するコロニーは強い青色として観察された。この方法を用い、13個の陽性コロニーが得られた。これらの陽性コロニーのそ

れぞれからプラスミド miniprep を上記の Birnboim に記述されているアルカリ溶菌法により調製した。各プラスミドを [coRI] で消化し、生じたフラグメントを Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring, New York (1982) で Maniatis が述べているポリアクリルアミドゲル電気泳動法により分離した。大半のプラスミドには 4.3kb の単一挿入フラグメントが含まれていた。他のプラスミドにはこのフラグメント以外のフラグメントが含まれていた。この結果によりすべての陽性コロニーは 4.3kb フラグメントに含まれている共通のクローン化遺伝子の表現の結果として生じたことが示唆された。4.3kb フラグメントのみを含むプラスミドの 1 つ (pSNE4 と呼ぶ) を詳細な分析のために選択した。プラスミド pSNE4 を 6bp 認識配列を示す各種制限酵素で消化した。これらの酵素は単独または組合せて用いた。これらの実験により得られたフラグメントの大きさの分析により pSNE4 の 4.3kb EcoRI 挿入断片の予備的な制限エンドヌクレアーゼ切

断地図が作成できた。この地図を第 1 図に示した。少なくとも 840bp のプラスミド pSNE4 の [coRI] 挿入断片のいくつかのサブフラグメントを、いずれかが機能性遺伝子を含んでいるか否かを検討するために、pBR322 にサブクローン化した。機能性リバーゼ遺伝子を含むことが見出されたプラスミドに pSNE51 があり、これは pSNE4 の [coRI] 挿入断片の 2.3kb EcoRI/SalI フラグメントを含んでいた (このフラグメントの地図上の位置については第 1 図参照)。

pSNE51 の挿入フラグメントをさらに制限酵素で消化し、生じた小さなフラグメントを Nucleic Acids Res., 12, supplement r167-r204 (1984) で Roberts が述べているバクテリオファージ H13 ベクターにサブクローン化し、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, pp. 5463-5467 (1977) で述べられている Sanger らのチェインターミネーター法により配列決定を行った。SphI 部位間の DNA の 1.36kb の配列により (第 1 図参照)、すべての可能なリーディングフレームで翻訳する場合、直接的なアミ

ノ酸配列で決定されるタンパク質のアミノ末端のアミノ酸残基 (残基 1-16) を含む大きなオープンリーディングフレームが明らかとなった。このオープンリーディングフレームは他の 2 つの直接的に配列決定をしたペプチド (残基 94-105 および残基 173-190) のコードも含んでいた。22 番目のメチオニンはシグナルペプチドに特徴的な疎水性の高い領域のコードを開始させるので、開始コドンであると考えられる。このシグナルペプチドは分泌過程に 1 番目のアラニンの後で切断されると推定される。オープンリーディングフレームは 259 番目で終わるので、これはコード化された成熟タンパク質の残基数は 258 個であることを示す。E. Coli における P. putida リバーゼ 1 遺伝子の調節された表現

E. Coli における P. putida リバーゼ遺伝子の調節された表現を行なわせるために、DNA, 2, pp. 183-193 (1983) で Adelman が述べているバクテリオファージ 13 における特定部位の突然変異誘発法により AIG 開始コドンの直前に XbaI 部位をまず挿入し

た。ついで、この修飾遺伝子を Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, p. 2125 (1983) で deBoer が述べている強力な lacII プロモーターを含む表現ベクターにクローン化した。これはまず pSNE51 を SphI で消化して行った。

リバーゼのコード配列全体を含む 2.4kb SphI フラグメントを単離し、SphI の部位で H13mp19 の複製型分子 (RF) に結合させ、この混合物を E. coli JM101 (ATCC 33876) のトランスフェクションに用いた。透明なプラークを検出し、SphI フラグメントが反時計回りの方向でみとめられるバクテリオファージ (錐型) DNA を調製した。リバーゼ 1 の AIG 開始コドンからすぐ 50 番目の位置に XbaI を含み、50 個のヌクレオチドからなる部分的に相補性をもつ一重鎖 DNA フラグメントを合成した。この 50 個からなるフラグメントは -27 番目のヌクレオチドの位置 (AIG 開始コドンの前) から -9 番目の位置および +1 (AIG の A) から +20 番目の位置まで錐型 DNA と相補性をもつ。しかし、-9 番目から +1 番目の間の生のリバーゼプロモーター領域

の配列5'-AACCTTCG-3'はtacIIプロモーターの5'-TATCTAGAAAT-3'に変更しなければならず、突然変異を誘発させた。

変異領域を範囲とする³²P標識合成オリゴヌクレオチド(5'-ATGAGGTATCTAGAAATATG-3')とのハイブリッド形成により300個のアークについてスクリーニングを行った。ハイブリッド形成陽性のクローンのRFを調製し、XbaIおよびSphIで切断した。遺伝子を含む1kb XbaI/SphIフラグメントを単離し、上記のdeBoerが述べているpHGH907tacIIのXbaIおよびSphIの消化、tacIIプロモーターおよびアンピシリン抵抗性遺伝子を含む4.1kbのXbaI/SphIフラグメントの単離により得られるベクターに結合させた。ついでJH101細胞を結合混合物で形質転換させた。(プラスミドpSHtacIIを含む—第2図参照)アンピシリン抵抗性コロニーを選択した。

*E. coli*が合成するクローン化リパーゼ1の濃度を測定するために、JH101/pSHtacIIを1mMのイソプロピル-β-D-チオガラクトシド(IPTG)を追加

した20mlのLB培地で37℃で10時間、増殖させた。294/pBR322を陰性対照として用いた。細胞を遠心により培養上清と分離した後、上記のKoshlandの方法にしたがい、ペリプラズムおよび膜/細胞質成分に分離した。各成分についてp-ニトロフェニル酪酸加水分解による活性を測定した。細胞の分離法の有効性を確認するためにProc. Natl. Acad. Sci. USA 81, pp. 2645-2649(1984)でGrayらが述べている方法にしたがい、β-ラクタマーゼ(ペリプラズムマーカー)およびβ-ガラクトシダーゼ(細胞質マーカー)も測定した。リパーゼ活性の大半(74%)は培養上清にみとめられた。細胞に結合した酵素の大半は細胞洗浄成分にみとめられ(全体の17%)、ペリプラズム成分(2%)および細胞質/膜成分(7%)にみとめられた量は少量であった。294/pBR322陰性対照培養試料成分にはリパーゼ活性はみとめられなかった。

プラスミドpSHtacIIを含む*E. coli*株JH101の発酵試料のpHを0.5M NaClに調整し、*P. putida*を発酵させる場合と実質的に同一の方法(実施

例4)でオクチルセファロースにより精製した。ただし、プロパノールによる勾配法は除外し、10mMリン酸ナトリウム、pH8.0、0.5M NaClに加えた20%アセトニトリルで行った。(酵素を表現する遺伝子からクローン化された)単離製品をSDSゲルで分離した所、当初の*Pseudomonas putida*株から単離したリパーゼ製品と同一速度で移動した。

実施例10

2クローン化したリパーゼからの臭化シアヌフラグメントの調製

クローン化したリパーゼ1からの臭化シアヌフラグメントを次のようにして調製した。クローン化した製品のオクチルセファロースによる精製品(実施例9)を3容具の溶液Aで希釈し、*Pseudomonas putida*から単離したリパーゼ1およびリパーゼ2について述べたように同じC4 HPLCカラムで精製した。精製品をSDSゲルで分析した。

実施例11

*P. putida*のリパーゼ1のCNBrフラグメントと
*E. coli*においてクローン化したリパーゼ1のCNBr

フラグメントの比較

*P. putida*から得られたリパーゼ1のCNBrフラグメントと*E. coli*においてクローン化したリパーゼ1のCNBrフラグメントを比較した。*Pseudomonas*から得られたHPLC精製リパーゼ1および2、およびクローン化したリパーゼ1をそれぞれ上記の実施例6で述べたようにCNBrにより加水分解した。生成物をSDS/尿素/ビリジン電気泳動法で分析した。得られた結果はクローン化したタンパク質は明らかにリパーゼ1であることを示す。(実施例4-5で示した)*P. putida*から単離されるリパーゼ1は次の結果により*E. coli*から単離されるクローン化リパーゼ1と同一であることが示された:
(a)いずれの細胞から得られたリパーゼ1も(実施例4と)同一のクロマトグラフィにより単離された;
(b)いずれの細胞から単離されたリパーゼ1のN末端アミノ酸配列も同一であった;
(c)CNBrフラグメントのパターンによりリパーゼ1とリパーゼ2は明らかに識別され、また*P. putida*および*E. coli*双方から得られるリパーゼ1のCNBrフ

ラグメントは同一であることが示された；(d) 双方の細菌から得られたリパーゼ 1 の p-ニトロフェニル酪酸塩および p-ニトロフェニルカブリン酪酸塩に対する活性比率は同一である；および (e) 蒸質をトリカブリンとする場合の加水分解/過加水分解の比率は双方の細菌から単離されたリパーゼ 1 について同一である。

実施例 12

過酸生成の測定

O-フェニレンジアミン ("OPD") の酸化をモニターすることによる過酸生成量測定法を開発した。過酸による OPD の酸化は H₂O₂ の場合よりはるかに迅速であり、458nm における吸光度が増加する。この測定法では測定する反応混合液 0.1ml を取り、OPD 溶液 0.2ml を添加し（一部の例ではあるが、OPD を最初の反応混合液に添加した）、室温で 5 分間、インキュベートし、CHCl₃/CH₃OH (1/1v/v) 0.9ml を添加、1 分間、遠心して 458nm における吸光度を読む。（C8 過酸に対する）標準プロットは少なくとも 36ppm の過酸まで直線的であった。

し（それぞれ 400ppm および 800ppm）、対照の場合と同様に加水分解活性を測定した（ $\mu\text{mole NaOH/分}$ ）。表 2 にそのデータを示した。

表 2

試料	添加物質	加水分解活性 ($\mu\text{mole NaOH/分}$)
1	(対照) 0ppm ベルオクタン酸	0.48
2	30ppm ベルオクタン酸	0.242
3	(対照) 0ppm 過酸化水素	0.51
4	400ppm H ₂ O ₂	0.413
5	800ppm H ₂ O ₂	0.379

表 2 に示したように、この粗製酵素製品の加水分解活性はベルオクタン酸、過酸化水素の存在により低下した。しかし、酵素に有害な酸化的環境にもかかわらず、酵素製品は十分な加水分解活性をもつと考えられた。

同様に、同量の市販酵素 (K-30) に 400ppm または 800ppm の過酸化水素を添加し、反応液の容量を 2ml にして測定した。それぞれにおいて 0.5ml x トリオクタノイン、100mM NaCl および 10mM リン

実施例 13 は望ましい酵素 ("リパーゼ 1") ともう一方のそれほど望ましくない他の酵素 ("リパーゼ 2") を含む「粗製」製品が 30ppm のベルオクタン酸または 800ppm までの過酸化水素のいずれかの存在下で許容できる加水分解活性をもつことを示すものである。

実施例 13

過酸化水素および過酸の存在下におけるリパーゼの安定性

実施例 1 の酵素製品（実施例 1(C) のようにリパーゼ 1 とリパーゼ 2 の混合物を含む）1mg/ml を 0.5ml x のトリオクタノイン、100mM NaCl および 10mM リン酸ナトリウムと混合し、5 例の試料それぞれについて反応液の容量を 2ml、pH 10 とした。各試料の反応混合液を 30℃ に保った。5 例の試料について次のようにして加水分解活性を測定した。

1 例の試料についてはベルオクタン酸 30ppm を添加し、対照（非ベルオクタン酸添加）の場合と同様に酵素の加水分解活性を測定した（ $\mu\text{mole NaOH/分}$ ）。他の 2 例の試料には過酸化水素を添加

酸ナトリウムを加えた。対照の場合と同様に加水分解活性を測定した（ $\mu\text{mole NaOH/分}$ ）。表 2 と比較するためにそのデータを表 3 に示した。

表 3

試料	添加物質	加水分解活性 ($\mu\text{mole NaOH/分}$)
6	(対照) 0ppm H ₂ O ₂	0.223
7	400ppm H ₂ O ₂	0.135
8	800ppm H ₂ O ₂	0.056

表 2 と表 3 とを比較すると、本発明による酵素は既知の酵素に比較し、酸化的環境においてかなり安定性が高い（感受性が低い）ことが分る。

実施例 14A は実質的に純粋な望ましい酵素（リパーゼ 1）製品は 400ppm の過酸化水素およびトリオクタノインのベルヒドロ分解により生成する 4-7ppm のベルオクタン酸の存在下で不活性化されず、秀れた加水分解活性をもつことを示すものである。実施例 14B は加水分解に対する過加水分解の比率に対する pH の影響を示すものである。

実施例14Aリパーゼ 1の安定性

実施例 4の酵素製品（実質的に純粋なリパーゼ 1）を過酸化水素の存在下および非存在下で検査した。加水分解速度は $\mu\text{mole/ml/10分}$ の単位で測定した。各試料には 0.1wt% ドデシル硫酸ナトリウム（“SDS”）で乳化した 1.0wt% のトリオクタノインおよび 4mg/ml の α -フェニレンジアミン（OPD）を加えた。各試料の反応容量は2ml、温度は27℃とした。実質的に純粋なリパーゼ 1製品は400ppmの過酸化水素、およびベルヒドロ分解により阻害する過酸の存在下で全く不活性化しなかった。

実施例14BpHの影響

実施例 4の酵素製品を次の一定した反応条件で検査した： 0.1wt% SDS中の1wt% トリオクタノイン、380ppm H2O2、1 $\mu\text{g/ml}$ 酵素、2mg/ml OPD、反応容量5ml、27℃。各反応液のpHは 8から11に調整し、過加水分解および加水分解値は $\mu\text{mole/ml/5分}$ の単位で測定した。至適pHは約pH10のようである。

市販の多くの酵素はアニオン性界面活性剤の存在により阻害される。実際に、SDS のようなアニオン性界面活性剤はタンパク分子に結合し、タンパク質を棒のような形に変換し、元の荷電をSDS の負荷電で遮蔽することによりSDS 電気泳動法のような方法においてタンパク質を可溶化するために通常、用いられている。大半ではないにしても多くの市販の洗剤にはアニオン性界面活性剤が含まれているので、アニオン性界面活性剤が存在しても酵素の加水分解活性が維持される作用は重要な利点である。

実施例 16はアニオン性界面活性剤の存在下における本発明による酵素の加水分解活性の維持および比較のための市販酵素による活性の阻害を示すものである。

実施例16アニオン性界面活性剤の存在下におけるリパーゼ 1とリパーゼ K-30の活性の比較

特定の酵素を除き、成分および/または反応条件を同一にした試料を調製した。比較試料は

実施例 15は本発明の新規な酵素はエステルより脂質に対して強い酵素活性をもつことを示すものである。

実施例15各種基質からの過酸生成

各試料において40mMリン酸バッファー中、H2O2は380ppm、OPDは2mg/ml、酵素（実施例 1で調製したリパーゼ 1とリパーゼ 2の混合物を含む）は1 $\mu\text{g/ml}$ 、基質（SDS で乳化、基質/SDS の比率は10:1）とした。pHは 9.0(pH スタット)は1wt%、温度は27℃、反応容量は5ml であった。表 4に $\mu\text{mole/ml/10分}$ の単位でデータを示した。

表 4

基質	加水分解 (酸生成量)	ベルヒドロ分解 (過酸生成量)
トリオクタノイン	4.24	0.42
オクタノ酸メチル	0.66	0.11

データが示すように、本発明の新規な酵素の活性は（単純なエステルに関連して）トリグリセリド基質に対して強く、リパーゼであることが分る。

Amano が市販しているリパーゼ K-30を用いて調製した。この酵素は Aspergillus niger から得られるもので、濃度は 8.7 $\mu\text{g/ml}$ とした。本発明による酵素製品は実施例 4のように16.8 $\mu\text{g/ml}$ （リパーゼ K-30の加水分解速度に近い）とした。各試料には重量比で10:1のSDS で乳化したトリオクタノインを加えた。バッファーは10mMリン酸ナトリウムバッファー、pHは 10、温度は25℃。各試料の反応容量は共に2ml とした。SDS 存在下における各酵素によるトリオクタノインの加水分解のデータを表 5に示した。

表 5

基質量 (wt.%)	基質の加水分解 (μ l 0.1N NaOH/分)
------------	-----------------------------------

本発明による酵素の場合:

0.01	2
0.05	7
0.1	11
0.5	13
1.0	12

基質量 (wt.%)	基質の加水分解 (μ l 0.1N NaOH/分)
------------	-----------------------------------

市販酵素の場合

0.01	1
0.05	7
0.1	7.5
0.5	3
1.0	1.5

pHは10に固定し、温度は25℃とした。表 6に本発明による酵素の過加水分解活性を示した。

表 6

時間 (分)	過酸生成量 (ppm)
2	3.9
4	7.2
6	8.1
8	9.0
10	9.9

対照的に、市販の酵素リパーゼCES (*Pseudomonas* (1)より得られ、Amano が市販している) による過酸生成量は実質的に一定で低く (過酸が約 0.50ppm)、また市販のリパーゼKによる過酸生成量は実質的に一定で、さらに低かった (過酸が約 0.30ppm)。

加水分解に対する過加水分解の比率は非常に重要である。基質からの過酸への変換率ができるだけ高いことが望まれる。本発明による酵素では過酸/酸の比率がリパーゼCESのような市販酵素より高い。これは本発明による酵素は過酸生成のため

表 5のデータから分るように、上記 2種の酵素では基質量が 0.05wt%における加水分解活性は相互にはほぼ匹敵しているが、トリオクタノイン基質量を約 0.1wt%以上に増加させると、SOS 量の増加につれて市販酵素は阻害された。すなわちリパーゼK-30では過加水分解速度が相対的に不良であった。対照的に、本発明による酵素は上記アニオン性界面活性剤の存在により実質的に影響されなかった。

乳化剤としてポリビニルアルコールを用いた以外、実施例16に類似する検査では市販のリパーゼK-30と本発明による酵素は良好な加水分解速度を示した。

実施例 17

酵素の過酸生成の比較

実施例 3における酵素製品について過酸生成を測定し、0.5wt%のSOS存在下において2種の市販酵素の過酸生成と比較した。各検査試料では、過酸化水素を480ppm、酵素濃度を6 μ g/ml、トリオクタノインを5wt%およびSOSを0.5wt%とした。

めに、より効率よく基質を利用し、したがって、漂白処方に含まれる基質量が少なくて済むことを意味する。

実施例 18

リパーゼ 1と現在、市販されているリパーゼの過加水分解活性および加水分解活性の比較

400ppm過酸化水素、0.12N HPO_4^{2-} , pH10.0および種々の濃度の市販酵素 (Amano 社のCES) または本発明による酵素 (実施例1(C)の製品) を含む試料について過加水分解および加水分解を測定した。過加水分解は反応時間を14分としてチオ硫酸滴定により測定した。加水分解はpHスタットを用いて連続滴定法により同時測定した。トリオクタノイン基質量はPVA濃度を0.75wt%として、12.5wt%であった。本発明による酵素では基質の加水分解が低いほど、過酸生成量が多く、これは本発明による酵素はリパーゼCESと比較し、基質をより効率的に利用することを示した。

実施例1(C)に示す粗製製品は「リパーゼ 1」および「リパーゼ 2」と呼ぶ2種の酵素を含むこと

が見えられた。トリオクタノイン基質に対する過加水分解/加水分解の比率は異なり、リパーゼ 1 はリパーゼ 2 に比較し、過加水分解活性が秀れている。実施例 19 はこのような比率を示すものである。

実施例 19

リパーゼ 1 とリパーゼ 2 の加水分解活性および過加水分解活性に対する界面活性剤の影響

4例の試料を調製した。各試料の基質は 1wt%、界面活性剤は 0.1wt%(SOS または PVA)、 H_2O_2 は 400ppm、OPD は 4mg/ml であった。反応容量は 2ml、pH は 9.0、温度は 27℃ であった。リパーゼ 1 (実施例 3 の製品または実施例 9 の製品) またはリパーゼ 2 (実施例 4 の製品) を試料に添加した。表 7 にそのデータを示した。

界面活性剤	表 7		加水分解に対する過加水分解の比率
	リパーゼ 1 (p-ニトロフェニル酪酸塩) 加水分解 (単位)	リパーゼ 2 (p-ニトロフェニル酪酸塩) 加水分解 (単位)	
SOS	4	0	0.19
PVA	4	0	0.14
SOS	0	20	0.010
PVA	0	20	0.011
SOS	12	0	0.12
PVA	12	0	0.076

表 8

酵素量 (PNB・単位/ml)	加水分解 ($\mu\text{mole/ml}$)	
	5分	10分
3	1.7	3.2
6	3.5	5.9
12	6.1	10.1
	過加水分解 ($\mu\text{mole/ml}$)	
	5分	10分
3	0.42	0.54
6	0.51	0.78
12	0.57	0.87

・ p-ニトロフェニル酪酸塩加水分解

したがって、加水分解に対する過加水分解の比率は 5分後において、それぞれ 0.25、0.15 および 0.09 であり、10分後においてそれぞれ 0.17、0.13 および 0.09 であった。このように、酵素量が少ないほど、効率が良かった。

リパーゼ 1 とリパーゼ 2 を分離すると、p-ニトロフェニル酪酸塩および p-ニトロフェニルカプリル酸に対して全く異なる加水分解速度 (加水分解

表 7 のデータから分るように、アニオン性界面活性剤の存在下においてリパーゼ 1 のトリオクタノイン基質に対するベルヒドロラーゼ活性はリパーゼ 2 より秀れており、非イオン性界面活性剤の存在下におけるベルヒドロラーゼ活性とはほぼ匹敵している。

実施例 20 は本発明による新規な酵素を過剰にすると加水分解は増加するが、過酸は増加しないことを示すものである。この場合にも、基質の利用が効率的であることが示される。

実施例 20

過加水分解/加水分解の比率に対する酵素濃度の影響

基質は 0.1wt% SOS で乳化した 1wt% のトリオクタノインとし、過酸化水素は 400ppm、OPD は 4mg/ml、pH は 9.0、温度は 25℃、反応容量は 5ml であった。酵素量 (実施例 4 の製品) は 3種類とした。結果を表 8 に示す。

活性)をもつことが見い出された。したがって、これら 2 種の新規な酵素は実施例 21 で示すように p-ニトロフェニルカプリル酸の加水分解に対する p-ニトロフェニル酪酸塩の加水分解の比率により識別することができる。

実施例 21

基質を p-ニトロフェニル酪酸塩および p-ニトロフェニルカプリル酸とする場合のリパーゼ 1 とリパーゼ 2 の加水分解速度

反応は非イオン性界面活性剤 Triton X-100 (Rohm & Haas 社が市販) 0.1wt% を含む 0.1M Tris-HCl、pH 8.0 を用い、温度を 25℃ として行った。リパーゼ 1 (実施例 3 の製品) については 2.0mM p-ニトロフェニル酪酸塩 (PNB) を基質とする場合の加水分解速度は 0.60 (0.415nm/分) であるのに対し、2.0mM p-ニトロフェニルカプリル酸 (PNC) を基質とする場合は 0.09 であり、PNB/PNC の比率は 7 であった。対照的にリパーゼ 2 については PNB を基質とする場合の加水分解速度は同一濃度で 0.54 であり、同一濃度の PNC を基質

とする場合は 0.44、したがって PHB/PNC の比率は 1であった。

基準酵素はアニオン性界面活性剤の存在のような市販酵素に対して有害な条件でも広汎な範囲の界面活性剤の存在下で過酸を生成することが示されている。

実施例 22

リパーゼ 1および 2種の市販リパーゼの過加水分解活性

基準酵素（実施例 1(C)の製品）、市販のリパーゼ K または市販のリパーゼ C[S のいずれかを含む試料を基質（トリオクタノイン）、過酸化水素および界面活性剤（アニオン性および非イオン性）の混合物を含む水溶液に溶解した。溶液は室温に保ち、pHは10.0とした。表 9に示すように14分後における過加水分解量を ppm 単位で計算した。

表から分るように、基準酵素はアニオン性界面活性剤などの界面活性剤の存在下で著明に秀れた過加水分解活性をもつ。

ましい官能基を含む基質を既にのべた実施例におけるトリグリセリド基質の代りに使用することができた。

さらに、上記に示した官能基をもつ望ましい基質群 (i)、(ii) および (iii) に関連して、最初の官能基群をもつ特異的な基質の実例は既に述べた実施例で明らかである。他の 2種の基質群の基質の実例は実施例 23で述べるプロポキシ化エステル合成法で明らかにする。

実施例 23

カルボン酸のプロピレングリコールモノエステル調製法には次の段階がある：

(1) 型生成および脱水：カルボン酸 1当量と炭酸ナトリウム 0.09 当量をマグネチックスターラと加熱用油浴を備えた丸底フラスコ中で混合した。脱水のために、スラリーを常に攪拌しながら真空下、150℃で約 1時間、加熱した後、常圧に戻し、室温まで冷却した。

(2) エステル化：段階 (1) の冷却したカルボン酸／カルボン酸塩をプロピレンオキシド約 6当量と

表 9

酵素 (mg/ml)	洗剤 (mg/g)	トリオクタノイン： 乳化剤 (mg/g)	H ₂ O ₂ (ppm)	加水分解 (ppm)
基準酵素	0.028	9.5:0	400	4.0
市販酵素	0.026	9.5:0.05 (デオキシコール酸 ナトリウム)	400	1.8
基準酵素	0.028	9.5:0.15 (デオキシコール酸 ナトリウム)	381	3.4
基準酵素	0.028	9.5:0.01 (ラウリルスルホン酸 ナトリウム)	397	3.3
リパーゼ K	0.028	9.5:0	505	0
リパーゼ C[S	0.028	9.5:0	400	0
リパーゼ C[S	0.026	9.5:6.9 (プロピレングリコール)	417	0

* 45. wt. % CAISOFL F-90 (アルキルベンゼンスルホン酸、Pilot Chemical社が市販) 40. wt. % SLS (ラウリルスルホン酸ナトリウム) および 14. wt. % MEORL25-7 (平均エトキシ C12-C15 のアルコール、Shell Chemical社が市販)

既に述べた実施例は上記に示した望ましい基質の官能基 (i) をもつトリグリセリド基質の使用に基づいている。同一の官能基をもつ他のグリセリドを既にのべた実施例におけるトリグリセリドの代りに使用することができた。同時に、上記に示した他の基質、特にエトキシ化エステル (ii) およびプロポキシ化エステル (iii) からなる望

混合し、還流しながら約 60℃の油浴で約 8時間、加熱し、エステル化反応を完了させた（エステル化反応が完了したことは G. 測定により確認した）。(3) 還流混合物を採取し、過剰のプロピレンオキシドを沸騰・除去した。酸 100mmole 当たりジエチルエーテル約 200ml を添加し、生じた溶液を 5% 炭酸ナトリウム 2容量を用い、分液ロートで抽出した。次にブライン 1容量を添加した。エーテル相を炭酸ナトリウムで乾燥、ろ過し、ロータリーエバポレーターで濃縮してエステル生成物を得た（通常、純度約 90%）。

官能基の付いた基質群 (ii) および (iii) にしたがう官能基の付いた基質の他の実例も同様の方法で生成することができる。

実施例 24はいくつかの望ましい処方についての紫色の除去試験を示すものである。

実施例 24

酸化剤の性能の評価はクリスタルバイオレットで染色した帯状の綿布（100%）で行った。クリスタルバイオレット（0.125g）を蒸留水 1.25 リッ

トルに添加した。長さ250cm、幅5cmの染色されて
いない綿布(100%)を溶液につけ、8時間、攪拌
した。(クリスタルバイオレットで染色された)
綿布を染色液から取出し、洗浄液がほとんど無色
になるまで冷たい水道水で反復洗浄した。次に、
染色した綿布を個別にアルミホイルに載せ、紙タ
オルで拭い、風乾した。

対応する対照(control)成分と同様に、基準酵
素を加えた3種の望ましい成分を調製した。基準
酵素を含む3種の成分とこれに対応する3種の対
照成分をそれぞれ用いて上記の染色綿布を洗浄し、
着色除去性能をそれぞれについて評価した。性能
結果を表10に要約した。

表10

基準成分(a) 0.04wt.% トリオクタンノイン 100µm 11 ₂ O ₂ 1.00wt.% リン-ゼ1 20µM 101A (pH=10.5)	63.6
基準成分(a) 0.04wt.% トリオクタンノイン 100µm 11 ₂ O ₂ 20µM 101A (pH=10.5)	50.6
基準成分(b) 0.04wt.% トリオクタンノイン 200µm 11 ₂ O ₂ 1.00wt.% リン-ゼ1 20µM 101A (pH=10.5)	80.4
基準成分(b) 0.04wt.% トリオクタンノイン 200µm 11 ₂ O ₂ 1.00wt.% リン-ゼ1 20µM 101A (pH=10.5)	69.8
基準成分(c) 0.04wt.% トリオクタンノイン 500µm 11 ₂ O ₂ 3.00wt.% リン-ゼ1 20µM 101A (pH=10.5)	67.4
基準成分(c) 0.04wt.% トリオクタンノイン 500µm 11 ₂ O ₂ 20µM 101A (pH=10.5)	52.2

表10のデータから分るように、対照成分には過酸化水素成分が含まれているものの、基準酵素を含む成分では対照成分に関連して着色除去の効果が改善された。このような着色除去の改善は酵素的過加水分解系によるものであり、多くの既知の市販酵素を阻害するアニオン性界面活性剤の存在下でみとめられる点で特に顕著である。

既に述べた種々の実施例で開示された過加水分解系、いいかえると活性化酸化剤系は織物の洗浄に通常、使用されている広範囲の洗剤処方と併用して使用することができる。米国における洗濯用途のための通常の強力な粉末洗剤にはアニオン性および/または非イオン性界面活性剤、リン酸または非リン酸ビルダー、緩衝剤、および光沢剤、香料、タンパク質分解酵素などのような種々の添加剤が含まれている。本発明の過加水分解系はそれ自体、または上記の通常の粉末洗剤の微量成分として使用できる。

ヨーロッパにおける通常の強力な粉末洗剤には
米国の洗剤とほぼ同一の公称成分が含まれている

ことが望ましい。木発明の特に望ましい酵素的過加水分解系における過ホウ素酸ナトリウム四水和物、トリオクタノインおよび細胞酵素 1 の重量比は 95:39:1 である。このような洗濯用添加剤方は製品の使用濃度が約 0.17% の場合に洗濯液中で約 25-50ppm A.O. (過酸化ホウ素量)、2-20ppm A.O. (理論的過酸量) および 0.1ppm から 10ppm の酵素を生成する。

実施例25は本発明の修飾酵素を得るためにA1CC 53552のリバーゼ 1について行った特定塩基対の特異的変更を示すものである。

实施例 25

AICC 53552から得られるリパーゼ 1遺伝子につ
いての特定塩基対の特異的変更はBiochem. J. ,
237, pp.1-7(1986)でCarlierが述べている方法に
より行った。リパーゼ 1遺伝子全体とlac IIプロ
モーターを含むPSM lac IIのEco RI-Sph Iフラグ
メントを[Eco RIおよびSph Iで消化してあるM13
HP 18 ベクターに結合させた。このようにDNA セ
ンス鎖を調製し、突然変異誘発鎖型として使用し

が、洗剤製品の使用濃度は（米国における通常の濃度 0.15%ではなく）洗濯機中で通常、1.2%である。通常の洗剤処方と併用して包装する本発明の過加水分解系の望ましい処方は過酸化物源が約 3-30wt%、塩質が約 0.6から約 12wt%、界面活性剤が約 0.001から約 0.7wt%である。

米国における通常の洗濯用途では（通常、洗剤には着色除去のための酸化性漂白剤および酵素は含まれていない）、性能を改善するために洗剤の他に酸化剤（通常は過ホウ素酸ナトリウムまたは過炭酸ナトリウム）および酵素（タンパク質分解性およびデンプン分解性）を含む製品を使用するのが一般的である。このような酸化剤を含む製品は洗濯機における製品使用濃度が約 0.17% の場合に約 25-50ppm の A.O.（過酸化水素）が得られるように通常、処方されている。本発明による過加水分解系を約 21℃ から約 38℃ の温度で洗濯水中で洗剤と共に使用することを目的とする場合には、望ましい処方の過酸化水素源、基質および修飾酵素の重量比は 2400:200:1 から 48:20:1 の範囲である。

た。アミノ酸の変更のために望ましい突然変異コードを含む合成プライマーを一重鎖鎖型にアニリングし、1個以上の不適正塩基対をもつ二重鎖領域を形成させた。プライマーおよび鎖型から二重鎖プラスミドを作るためにヌクレオチドおよび必要な酵素を添加した。得られたプラスミドを *E. coli* JH101 に加えて形質転換を行なわせ、コロニーについてアミノ酸の変更を起こす望ましいヌクレオチドの変更の有無を分析した。例えば、126番目 (Ala または Tyr で) および 206番目 (Gln で) のアミノ酸が置換されている実質株を特定部位の突然変異誘発法により調製した。

特定塩基対の特異的変更はアミノ酸の変更を生じないで、独特のエンドヌクレアーゼ制限部位を作るためにもリパーゼ 1遺伝子について行った。用いた方法はMorrisら、Nucleic Acids Res., **11**, pp. 5103-5112(1983) およびWellsら、Gene, **34**, pp. 315-323(1985) に記載されている。

特定部位の突然変異誘発法は 126番目の活性部位のセリンのいずれかの側に 2組の独特の部位を

作るために行った。これらの変更はアミノ酸配列には影響せず、Aal II-Ban III部位であった。同様に、独特のBst XI-Ban III部位を活性部位の206番目のヒスチジンの付近に作った。これらの突然変異のそれぞれは個別に行われ、望ましいアミノ酸の変更を伴う合成DNA いいかえと、カセットDNA を結合できる（したがって、野生型のリパーゼ1遺伝子と交換できる）独特の部位をもつ2種の異なるプラスミドを生成した。特定の塩基対は次の通りである：

Aal II: CACITCからGACGICへ

Ban III: GGCICGからGGATCCへ

Bst XI: CCGGIGTICTGGからCCAGTGTICTGGへ

BAG III: GGIAGCからGGATCCへ

突然変異を誘発したBst XI部位が206番目のヒスチジンカセットに独特であるために、126番目のセリンのコドンがTCC からTCG へ変更することにより126番目のBst XI部位を除去しなければならなかった。

セリンカセットに突然変異部位をもつプラスミ

ドをpGClacII3A8 と呼び、lacII プロモーターと独特のAal II-Ban III 部位を含むリパーゼ遺伝子をもつpBR322プラスミドであることを示す。ヒスチジン部位の変異のプラスミドはpUC119lacII3B8 と呼び、lacII プロモーターと独特のBst XI-Ban III 部位を含むリパーゼ遺伝子をもつpUC プラスミドであることを示す。

上記の変更以外の単独のアミノ酸の変更を示すすべての変異は以上の方法で行った。浮動性変異を起こすためには、浮動性塩基変異を含むカセットを用いた。

二重変異株はAsp718およびAcc I を含み、126番目のアミノ酸領域における望ましい変異をもつプラスミドPGC lac II 3A8を消化して、300個の塩基対フラグメントを単離することにより構成した。206番目の領域でアミノ酸を変更させるプラスミドPUC 119 lac II 3B8を同一の制限エンドヌクレアーゼで消化し、生じたベクターに300個の塩基対をもつフラグメントを結合させた。

リパーゼ活性をもつ酵素を次のように単離した。

185ml とカルベニシリン(50 μ g/ml)を入れた試験管2本を用い、細胞を37℃で20時間、増殖させた。細胞をSorvall RC-S8 を用い、6000回転/分、4℃で8分遠心した。各細胞沈澱を20%スクロース、10mMリン酸ナトリウム（フィルター滅菌）を含む冷却液（pH8.0）1ml および0.25M EDTA 100 μ l に再懸濁した。懸濁液を氷冷して10-15分、インキュベートした後、6000回転/分、4℃で6分遠心した。上清について、加水分解活性および過加水分解活性を測定した。

初製は一般に次のようにして行った。発酵ブイオンを4000g で20分、遠心した。上清をデカンテーションで除去し、細胞ペーストを-70℃で凍結した。細胞ペーストを融解し、20%スクロース、10mMリン酸ナトリウム、pH8.0 を含むバッファー4容量を加えてワーリングブレンダーでホモジネートとした。30分、攪拌した後、ポリエチレンイミンを最終濃度が0.1% になるように添加し、さらに5分、攪拌した。次にスラリーを4000g で20分、遠心した。上清を0.22 μ のフィルターでろ

過し、伝導度が2.2ミリオームになるまで10mMリン酸ナトリウム、pH8.0 を上清に添加した。得られた製品について10mM リン酸ナトリウム、pH8.0を用いスルホニル-プロピルカチオン交換樹脂でクロマトグラフィを行った。リパーゼ酵素は250mM 塩化ナトリウム、10mM リン酸ナトリウム、pH8を用い、樹脂から溶出した。この時点における酵素製品の純度はSDS-PAGEにより判定すると95%以上であった。

E.coliで表現される秀れたベルヒドロラーゼをもつ変異株を検出するスクリーニング法は次の通りであった。突然変異を誘発したDNAを含む形質転換細胞をLuria アガロース(LA)と50 μ g/mlのカルベニシリンのプレートを用い、1.2 μ のセルロースアセテートフィルター上で菌液培養し、プレート(150mmシャーレ)当たり500のコロニーが得られるようにした。野生型対照株を各プレートの小さな部分に斑点接種し、プレートを37℃で20時間、インキュベートした。

形質転換株および野生型対照株を含むセルロー

スアセテートフィルターを取り除き、新鮮なIAとカルベニシリンを含むプレートに移し、4℃で保存した。フィルターを取り除いたプレートについて、プレート当たり次の成分を含むアガロースオーバーレイ液18mlを注ぎ、リパーゼの過加水分解活性のスクリーニングを行った：

0.8% アガロース, 0.4M NaH₂PO₄, pH9.5

0.1% トリオクタノイン / 0.01% SDS

500 ppm H_2O :

1ng/ml 0- トリジン

(過加水分解を示す)陽性対照では室温で2時間インキュベートすると暗褐色の呈色が見られた。

対応する各陽性コロニーを最初のフィルターから拾い、18と50 μ g/mlのカルベニシリンを含む液100 μ lを入れた96孔減菌titertekプレートの孔に播種した（1列には野生型対照株を播種した）。このプレートについて6-7時間（または一夜）増殖させた。96本の針の付いたプレートスタンパーを用いてセルロースアセテートフィルターの付いている18とカルベニシリンを含むプレートを37℃

で20時間、増殖させた。このプレートについて、最良の変異株を選択するために上記のオーバーレイ法を用いて、再びスクリーニングを行った。次にスタンプをしたフィルターからコロニーを拾い、37℃で6-7時間、5mlのLBで増殖させることにより単一のグリセロール保存株を調製した。このグリセロール保存株をさらに大規模な試験に用いた。

上記の調査およびスクリーニング法により、酵母菌素に関連して過酸の生成が旺盛するか、向上している多くの酵母菌素が変異リパーゼ 1 遺伝子をもつ *E. coli* コロニーから単離された。表 11 に本発明によるこのような酵母菌素を要約した。

[illegible]

過酸に対する酸の比率を決定する測定条件は次の通りであった:

基質 0.4% トリカプリリン

乳化剤 0.04% ドデシル硫酸ナトリウム

H₂O₂ 800ppm A.O.

50μM EDTA

反応pH 10.0

反応温度 RT

反応時間 14分

pHスタットではカプリル酸を生成するトリカプリリンの加水分解とベルオクタン酸を生成するトリカプリリンの過加水分解の双方が測定される。双方の酸生成物はベルオクタン酸のpKaが8.5であり、カプリル(オクタン)酸のpKaが3.5であるのでpHスタットにより測定される。データはpHスタットから14分間における生成量の全当量数として得られる。ベルオクタン酸はカタラーゼの添加によるH₂O₂の分解後、過剰の酸性化ヨウ化カリウムの添加および希釈ナオ硫酸による滴定によりBrinkman自動滴定装置で定量的に測定される。

EDTAは金属が触媒する分解を低下させることによりベルオクタン酸を安定化させると考えられる。過酸の滴定により過酸量が800で得られ、これをpHスタットで観察される酸の全量から差し引くと正味の加水分解(酸)量が得られる。

表11のデータから分るように、基準酵素に関連して効率が匹敵しているか、または相当に向上している多くの修飾酵素が調査された。

本発明を特定の実施例と関連させて述べてきたが、実施例では一層の変更が可能であり、このような応用には、一般的には本発明の原理にしたがい、また本発明が関係する技術分野における既知あるいは従来の実施内容の範囲に関連し、また上記に述べた不可欠な特徴に適用でき、また本発明の範囲および特許請求の範囲内に入るような開示内容からの新しい試みを含む本発明のあらゆる変化、用途または適応が含まれると理解されるべきである。

4. 図面の簡単な説明

第1図はpSNE4と呼ぶプラスミドの4.3kbEcoRI

1フラグメントの地図である。斜線領域はシグナルペプチドコドン(コドン-22から+1)を示し、斑点領域はリパーゼ1と呼ぶ成熟ポリペプチドのコード領域(コドン+1から+258)を示す。ATG開始コドンおよびTAA停止コドンも示してある。

第2図はシュードモナスリパーゼ1遺伝子のE. coli表現ベクターを示したものである。斑点領域は22個のアミノ酸からなるリパーゼシグナル配列のコード領域を示す。斜線領域は成熟リパーゼタンパク質のコード領域を示す。転写はATG開始コドンで始まり、矢印が示す方向に進行しTAA停止コドンで終了する。両側の太線部分は5'-および3'-非転写領域を示す。

特許出願人 ザ・クロロックス・カンパニー
代理人 非理士 竹内 澄夫

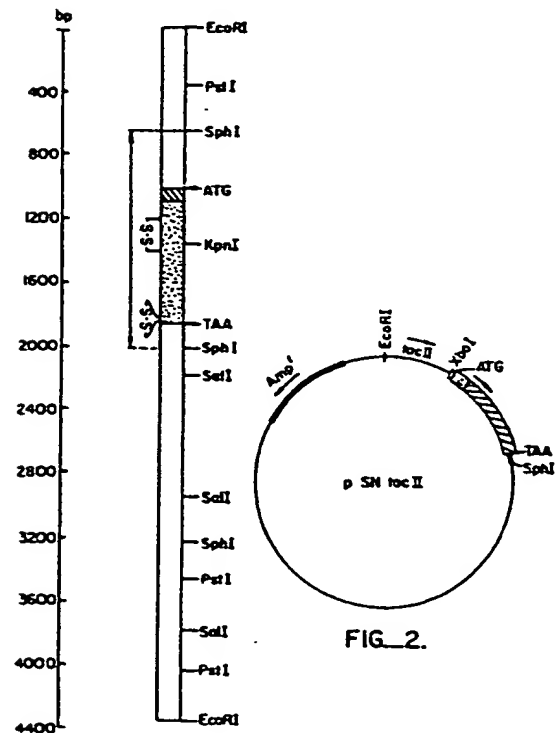


FIG. 1

FIG. 2

第1頁の続き

⑤Int. Cl. 9

識別記号

庁内整理番号

//(C 11 D 7/60

7:42

7:06

7:10

7:12

7:14

7:16

7:26)

(C 12 N 9/20

C 12 R 1:40)

(C 12 N 15/55

C 12 R 1:40)

6779-4H

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.